



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Relación de la concentración de inmunometabolitos del  
ambiente urinario con la distribución filogenética de  
*Escherichia coli* uropatógena en adultos mayores**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Arturo Octavio GONZALES RODRIGUEZ

**ASESOR**

Heli Jaime PASTOR BARRÓN

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Gonzales A. Relación de la concentración de inmunometabolitos del ambiente urinario con la distribución filogenética de *Escherichia coli* uropatógena en adultos mayores [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2019.

---

## Hoja de metadatos

1. Código ORCID del autor. - <https://orcid.org/0000-0002-6377-1596>
2. Código ORCID del asesor.- <https://orcid.org/0000-0002-4041-4406>
3. DNI del autor.- 44157359
4. Grupo de Investigación. - Grupo de investigación y docencia en Medicina Molecular.
5. Institución que financia parcial o totalmente la investigación. - Investigación financiada por la UNMSM y la Universidad de Piura (UDEP).
6. 6.- Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación.- Coordenadas geográficas de San Borja, Perú, en grados y minutos decimales: Longitud: 076°59'42.76" Latitud: S12°5'51.18".
7. Año o rango de años que la investigación abarcó.- Abarcó 1 año de estudio, siendo este el año 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Medicina

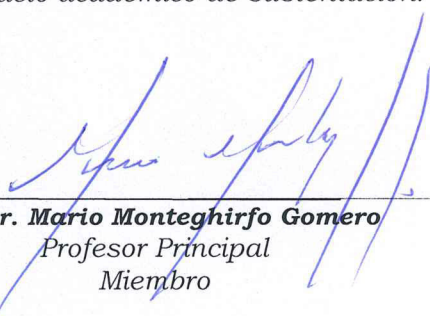



Unidad de Posgrado  
Sección Maestría

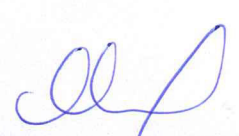
**ACTA DE GRADO DE MAGISTER**

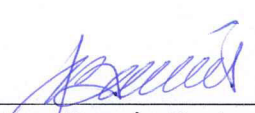
En la ciudad de Lima, a los 13 días del mes de diciembre del año dos mil diecinueve siendo las 10:00 am, bajo la presidencia de la Dra. Doris Virginia Huerta Canales con la asistencia de los Profesores: Dr. Mario Monteghirfo Gomero (Miembro), Mg. Luz Dora Velásquez Ramos (Miembro), Dra. Yesica Llimpe Mitma (Miembro) y el Dr. Heli Jaime Barrón Pastor (Asesor); el postulante al Grado de Magister en Bioquímica, Bachiller en Tecnología Médica, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOMETABOLITOS DEL AMBIENTE URINARIO CON LA DISTRIBUCIÓN FILOGENÉTICA DE ESCHERICHIA COLI UROPATÓGENA EN ADULTOS MAYORES"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B MUY BUENO 18**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** al postulante **ARTURO OCTAVIO GONZALES RODRÍGUEZ**.

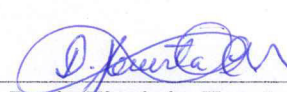
Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 11:30 am, se da por concluido el acto académico de sustentación.

  
**Dr. Mario Monteghirfo Gomero**  
Profesor Principal  
Miembro

  
**Mg. Luz Dora Velásquez Ramos**  
Profesora Asociada  
Miembro

  
**Dra. Yesica Llimpe Mitma**  
Profesora Asociada  
Miembro

  
**Dr. Heli Jaime Barrón Pastor**  
Profesor Asociado  
Asesor

  
**Dra. Doris Virginia Huerta Canales**  
Profesora Principal  
Presidente

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Walter y Piedad por enseñarme siempre a perseverar e inculcarme valores para ser un mejor ser humano.

A Angie, por ser mi pilar con su apoyo incondicional e incentivarme a superarme siempre. A Aitana por ser la fuerza que me da aliento.

A mis hermanos Alejandro, Andres y Lissi por entusiasmarse en mis logros y estar siempre conmigo.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

- ❖ BtuB.- Receptor de membrana externa de la cobalamina.
- ❖ CAO.- Capacidad antioxidante de la orina.
- ❖ CRG.- Centro de residencia geriátrico.
- ❖ Grupo filogenético – *E.coli*.- Siete variantes clonales de *E.coli*: A,B1,B2,C,D,E y F descritas por Clermont y cols.
- ❖ IL – 1 $\beta$ .- Interleucina-1-beta.
- ❖ INEI.- Instituto Nacional de Estadística e Informática.
- ❖ ITU.- Infección del tracto urinario.
- ❖ Marcadores inmunometabólicos.- Analitos excretados en la orina y que guardan una relación importante en el metabolismo celular bacteriano e inmunológico.
- ❖ PAM.- Población adulta mayor.
- ❖ ROS.- Sustancias reactivas al oxígeno.
- ❖ TNF –  $\alpha$ .- Factor de necrosis tumoral alfa.
- ❖ UPEC.- *Escherichia coli* uropatógena.

## CONTENIDO

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	122
1.1 Situación problemática .....	123
1.2 Formulación del problema .....	14
1.3 Justificación teórica .....	15
1.4 Justificación práctica .....	16
1.5 Objetivo .....	16
1.5.1 Objetivos generales .....	16
1.5.2 Obetivos específicos .....	16
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Antecedentes de investigación .....	17
2.2 Bases teóricas .....	22
2.3 Marco conceptual .....	23
CAPITULO III: METODOLOGÍA .....	25
3.1 Tipo y diseño de la investigación .....	25
3.2 Unidad de análisis .....	26
3.3 Tamaño de muestra .....	26
3.4 Población de estudio .....	27
3.5 Selección de la muestra .....	27
3.5.1 Criterios de inclusión .....	27
3.5.2 Criterios de exclusión .....	27
3.6 Técnicas de recolección de datos .....	27
3.6.1 Examen completo de orina .....	28
3.6.2 Cultivo microbiológico .....	28
3.6.3 Identificación bacteriana .....	28
3.6.4 Extracción de ADN .....	29
3.6.5 Determinación filogenética .....	30
3.6.6 Determinación del hierro total .....	32
3.6.7 Determinación de IL1- beta .....	34
3.6.8 Determinación de TNF - alfa urinaria .....	36



3.6.9 2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) .....	38
3.6.10 2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) .....	40
3.6.11 Determinación de Vitamina B12 .....	41
3.7 Consideración ética .....	42
3.8 Análisis e interpretación de la información .....	42
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
CAPITULO V: CONCLUSIONES.....	59
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES .....	60
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
CAPITULO VIII: ANEXOS .....	71

## LISTA DE TABLAS

Distribución de muestras según casa de reposo .....	Tabla 1
Primers y Concentración - Clermont PCR .....	Tabla 2
Condiciones de cliclaje PCR – Clermont.....	Tabla 3
Resultados curva de estandarización hierro .....	Tabla 4
Resultados absorbancia - curva de estandarización IL - 1 $\beta$ .....	Tabla 5
Resultados curva de estandarización TNF – $\alpha$ .....	Tabla 6
Resultados curva de estandarización ABTS .....	Tabla 7
Resultados curva de estandarización FRAP .....	Tabla 8
Resultados de hierro en orina de pacientes con ITU y sin ITU .....	Tabla 9
Resultados de hierro en orina v.s grupos filogenéticos <i>E.coli</i> .....	Tabla 10
Concentración de IL - 1 $\beta$ en orina v.s grupos filogenéticos <i>E.coli</i> .....	Tabla 11
Concentración del TNF - alfa en orina pacientes con ITU y sin ITU .....	Tabla 12
Concentración del TNF – $\alpha$ en orina grupo B2 v.s grupos A,B1,C,D,E .....	Tabla 13
Resultados de FRAP y ABTS vs grupos filogenéticos <i>E.coli</i> .....	Tabla 14
Resultados de la CAO en orina de pacientes con ITU y sin ITU .....	Tabla 15

## LISTA DE GRÁFICOS

Curva de calibración hierro .....	Gráfico 1
Curva de calibración IL - $1\beta$ .....	Gráfico 2
Curva de calibración TNF – $\alpha$ .....	Gráfico 3
Curva de calibración ABTS .....	Gráfico 4
Curva de calibración FRAP .....	Gráfico 5
Frecuencia de <i>Escherichia coli</i> vs grupo clonal .....	Gráfico 6
Distribución IL - $1\beta$ .....	Gráfico 7
Distribución TNF – $\alpha$ .....	Gráfico 8
Distribución FRAP .....	Gráfico 9

## RESUMEN

**Introducción.-** Las enfermedades infecciosas son altamente recurrentes en adultos mayores residentes en centros geriátricos, siendo las infecciones del tracto urinario (ITU) la segunda más frecuente. El 80% de los casos de ITU en el mundo es causado por *Escherichia coli*, el cual presenta siete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F) y una distribución heterogénea en los casos de ITU. La capacidad de adaptación de los distintos grupos filogenéticos en el fluido urinario es un factor determinante para su desarrollo en el tracto urinario.

**Objetivos.-** Evaluar la relación de la concentración de los marcadores inmunometabólicos del ambiente urinario con la distribución filogenética de *Escherichia coli* uropatógena en adultos mayores.

**Metodología.-** Estudio analítico correlacional, en el cual se enrolaron 24 pacientes con infección del tracto urinario y 17 sin infección del tracto urinario. Primero, se cuantificó el hierro en orina por espectrofotometría, segundo, el TNF –  $\alpha$ , tercero, la IL - 1 $\beta$  por enzimoimmunoensayo, cuarto, la capacidad antioxidante en la orina por las metodologías de ABTS<sup>+</sup> y FRAP y quinto, la determinación de la filogenia de *E.coli* por el método de Clermont.

**Resultados.-** La concentración de hierro en la orina de los pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo fue de 193,48 ug/L y en pacientes con infección por *E.coli* - B2 negativos de 160,12 ug/L ( $p = 0.316$ ). La concentración de TNF –  $\alpha$  en la orina de los pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo fue de 84,26 ug/L y en pacientes con infección por *E.coli* - B2 negativos de 58,12 ug/L ( $p = 0.168$ ). La concentración de IL - 1 $\beta$  en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo fue de 386,96 pg/mL y de pacientes con infección por *E.coli* - B2 negativos 294,79 pg/mL ( $p = 0.245$ ). Finalmente, la capacidad antioxidante de la orina ensayada con la técnica ABTS<sup>+</sup> tuvo una tendencia positiva en los pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo ( $p =$

0.121) en comparación con la orina de los pacientes con ITU por *E.coli* –B2 negativos (1636,07 vs 885,94 ug/mL).

**Conclusiones.-** Se evidencia una tendencia diferenciada en la respuesta inmunometabólica frente a los grupos clonales de *Escherichia coli* uropatógena estudiados.

## ABSTRACT

**Introduction.** - Infectious diseases are highly recurrent in older adults residing in geriatric centers, with urinary tract infections being the second most frequent. 80% of cases of UTI in the world are caused by *Escherichia coli*, which has seven phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E and F) and a heterogeneous distribution in cases of UTI. The adaptability of the different phylogenetic groups in the urinary fluid is a determining factor for their development in the urinary tract.

**Objective.** - Assess the relationship between the concentration of immunometabolic markers in the urinary environment and the phylogenetic distribution of uropathogenic *Escherichia coli* in older adults.

**Methodology.** - Correlational analytical study, in which 24 patients with urinary tract infection and 17 without urinary tract infection were enrolled. First, the iron in urine was quantified by spectrophotometry, second, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by enzyme immunoassay, fourth, the antioxidant capacity in urine by ABTS<sup>+</sup> and FRAP methodologies and finally, the determination of the phylogeny of *E. coli* by the Clermont method.

**Results.**- The concentration of iron in the urine of patients with UTI due to *E.coli* - B2 positive was 193.48 ug/L and in patients with *E.coli* - B2 negative infection of 160.12 ug/L ( $p = 0.316$ ). The concentration of TNF- $\alpha$  in the urine of patients with UTI due to *E.coli*-B2 positive was 84.26 ug/L and in patients with *E.coli*-B2 negative infection of 58.12 ug/L ( $p = 0.168$ ). The concentration of IL-1 $\beta$  in patients with UTI due to positive *E.coli*-B2 was 386.96 pg/mL and of patients with negative *E.coli*-B2 infection 294.79 pg/mL ( $p = 0.245$ ). Finally, the urine antioxidant capacity tested by the ABTS<sup>+</sup> technique had a positive trend in patients with UTI due to positive *E.coli* - B2 ( $p = 0.121$ ) compared to the urine of patients with UTI due to *E.coli* -B2 negative (1636.07 vs 885.94 ug/mL).

**Conclusions.** - A differentiated tendency is observed in the immunometabolic response against the uropathogenic *Escherichia coli* clonal groups studied.

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación problemática

En el mundo, la esperanza de vida ha ido en aumento, el número de personas mayores de 60 años aumentó del 9%, en el año 1994, al 12% en el año 2014 y se estima que alcancen el 21% en el año 2050 (Sernicharo & Coronel, 2015). El Perú no es ajeno a esta realidad, en el último censo nacional se evidenció que la proporción de población adulta mayor (PAM), se incrementó de 9.1%, en el año 2007 a 11.9% en el año 2017, siendo el departamento de Lima el de mayor población envejecida (13.1%) (INEI, 2017a).

La PAM presenta una elevada prevalencia de enfermedades crónicas, ocasionada por condiciones inherentes al proceso de envejecimiento, las cuales están relacionados a un menor funcionamiento anatómico y fisiológico (Thakur, Banerjee & Nikumb 2013). En el Perú, el 82.1% y 70.6% de la PAM mujeres y hombres, respectivamente, padecen algún problema crónico de salud (INEI, 2017b). La vulnerabilidad de esta población ha suscitado la necesidad de implementar centros de residencia geriátricos (CRG) que faciliten una atención médica monitoreada, en Lima metropolitana se encuentran registradas 152 residencias geriátricas (CARPAM, 2017). Sin embargo, las enfermedades infecciosas son de alta recurrencia en los CRG y presentan una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en residentes adultos mayores institucionalizados (Montoya & Mody,



2011). Las infecciones del tracto urinario (ITU) son la segunda infección más frecuente en PAM (Stevenson, Moore, Colwell & Sleeper, 2005) (Engelhart, Hanses-Derendorf, Exner, & Kramer, 2005). En la PAM la probabilidad de desarrollar complicaciones a causa de una ITU, como pielonefritis, la cual puede desencadenar en bacteremia, hospitalización, terapia sistémica antimicrobiana, deterioro funcional y muerte, es más frecuente, lo cual acredita una mayor atención de este problema (Richards, C.L, 2004).

Se han descrito diversos factores de riesgo que condicionan la adquisición de ITU en la PAM, entre los cuales, el uso permanente de catéter vesical, la incontinencia urinaria y la incorrecta manipulación del adulto mayor con un bajo nivel de dependencia son algunos de los factores más relevantes (Nicolle, 2016). No obstante, de igual o mayor relevancia son los inmunometabolitos presentes en el ambiente urinario, como: IL-1  $\beta$ , TNF -  $\alpha$ , vitamina B12, hierro y aminoácidos, ya que pueden determinar el crecimiento, colonización y virulencia de la bacteria patógena (Alteri, et al. 2009) (Alteri, et al. 2007) (Vigil, et al. 2011) (Zav'yalov, et al., 1995) (Luo, Niesel, Shaban, Grimm, & Klimpel, 1993). La *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), es la causante de más del 80% de los casos de ITU en el mundo (Nicolle, 2016), con cinco grupos filogenéticos (A, B1, B2, D y E) (Clermont, 2000); y una distribución heterogénea en los casos de ITU. La capacidad patogénica y de supervivencia de las variantes filogenéticas de UPEC en el ambiente urinario está dada por una especificidad clonal (Pobiega, et al., 2013). Comprender la relación que existe entre los inmunometabolitos urinarios y las variantes filogenéticas de UPEC nos permitirá entender y desarrollar estrategias específicas que controlen este tipo de infecciones en la PAM.

## 1.2 Formulación del problema

¿Cuál es la relación de la concentración de determinados inmunometabolitos presentes en el ambiente urinario con la distribución filogenética de *Escherichia coli* uropatógena en adultos mayores?

### 1.3 Justificación teórica

Existe una alta prevalencia y recurrencia de ITU en adultos mayores residentes en centros geriátricos (Nicolle, 1994), ocasionándoles un alto deterioro sistémico, lo cual eleva la tasa de mortalidad en CRG (Nicolle, 2016). Entre los principales microorganismos causantes de ITU, la UPEC es el uropatógeno más frecuente, ocasionando más del 80% de los casos de ITU en el mundo (Nicolle, 2016).

El ambiente urinario es escaso en nutrientes en comparación con otros ambientes de hábitat bacteriano y con una capacidad importante de reclutamiento leucocitario. Debido a esto, la capacidad de adaptación de las UPEC es crucial para su supervivencia. Las UPEC presentan siete variantes clonales (Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000), con una frecuencia heterogénea de infección en el tracto urinario debido a una capacidad diferenciada de adaptación en el tracto urinario (Snyder, et al., 2004), que se puede evidenciar en una asimilación heterogénea de los metabolitos presentes en la orina y de su capacidad de evasión a la respuesta inmune.

Se han descrito diversos metabolitos de importancia fisiológica en el proceso de infección del tracto urinario en las UPEC, dentro de los cuales se encuentran el: hierro, serina, vitamina B12 (cobalamina), entre otros. Estos metabolitos son utilizados en el crecimiento, colonización y producción de factores de virulencia bacteriana (Alteri, et al. 2009) (Alteri, et al. 2007) (Vigil, et al. 2011) (Zav'yalov, et al., 1995) (Luo, Niesel, Shaban, Grimm, & Klimpel, 1993). Además, la supervivencia de la UPEC se encuentra condicionada a su capacidad de respuesta frente al ataque inmunológico mediado por los neutrófilos, para lo cual expresan distintos mecanismos que permiten la disminución de la respuesta inmunológica y evadir el estrés oxidativo (Olson & Hunstad, 2016)

## 1.4 Justificación práctica

Comprender el inmunometabolismo bacteriano no solo permitirá conocer la interacción que surge entre las variantes filogenéticas de *E.coli* y la concentración de los inmunometabolitos expuestos, sino además servirá de ayuda para postular variantes dietarias o terapéuticas direccionadas que limiten la capacidad de infección de estos microorganismos y así disminuir la recurrencia de ITU en la PAM.

## 1.5 Objetivo

### 1.5.1 *Objetivo general*

- Evaluar la relación de la concentración de los marcadores inmunometabólicos del ambiente urinario con la distribución filogenética de *Escherichia coli* uropatógena en adultos mayores.

### 1.5.2 *Objetivos específicos*

- Determinar las concentraciones de los marcadores inmunometabólicos: hierro, IL-1  $\beta$ , TNF – alfa, vitamina B12 y capacidad antioxidante total en la orina de adultos mayores con infección del tracto urinario.
- Determinar la distribución filogenética de *E.coli* aislados que ocasionan infección del tracto urinario en adultos mayores.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de investigación

En relación a los metabolitos de importancia metabólica para la ITU, ensayos experimentales de análisis proteómicos en UPEC, desarrollados en orina humana como medio de cultivo, han reportado un aumento en la expresión de la proteína BtuB (receptor de membrana externa de la cobalamina) (Alteri, et al. 2007), lo cual sugiere que su absorción tiene una importancia crítica en el proceso de colonización, ya que es la única vía de incorporación en *E.coli* de cobalamina debido a que no tiene la capacidad de sintetizar cobalamina a diferencia de otros microorganismos (Lawrence & Roth, 1995). Se conoce que la cobalamina participa en tres reacciones en la *E.coli*. Primero, como cofactor de la enzima MetH (Metionina sintasa cobalamina – dependiente), en la forma de metilcobalamina, la cual tiene como función catalizar el paso final en la biosíntesis de metionina (Cauthen, Foster, & Woods, 1966) (Davis, & Mingioli, 1950). Segundo, en la transferencia del grupo metilo de la molécula 5 – metiltetrahidrofolato a la homocisteína, también catalizada por la enzima MetH (Cauthen, et al. 1966) (Davis, et al. 1950). Tercero, como cofactor, en la forma de adenosilcobalamina, de la enzima etanolamina amonio liasa, la cual cataliza el primer paso en el catabolismo de la etanolamina (Scarlett, & Turner, 1976). Por lo mencionado anteriormente, se puede inferir que la cobalamina en la orina es un factor importante para la adquisición de ITU.

El hierro, a diferencia de la cobalamina, se ha corroborado como indispensable en el proceso de la ITU (Vigil, et al. 2011). Por lo mismo, las bacterias manifiestan hasta tres sistemas de absorción de hierro. Los sideróforos, pequeñas moléculas secretadas al ambiente con una alta afinidad al ión férrico, teniendo también la facultad, de unirse al metal a través de otros complejos en el hospedero (Wandersman, & Delepelaire, 2004). Los hemóforos, los cuales unen el hierro a través del grupo hemo (Wandersman, et al. 2004), y finalmente, a través de la captación directa del hierro en su estado ferroso (Kammler, Schön, & Hantke, 1993). Además, la relevancia de la absorción del hierro se ha manifestado por medio de estudios de expresión génica, a través de orina de paciente con ITU, donde los sistemas de absorción de hierro se han encontrado sobre expresados durante el proceso infeccioso (Hagan, Lloyd, Rasko, Faerber, & Mobley, 2010). En estudios complementarios de vacunas, usando a los receptores de sideróforos o a la proteína de unión al grupo hemo como antígenos, se ha evidenciado un efecto protector en modelos murinos con ITU (Alteri, et al. 2009), ofreciendo un soporte aún mayor sobre el requisito indispensable de virulencia que manifiesta el hierro durante el curso de la ITU.

Como se ha descrito anteriormente, las UPEC que se desarrollan en la orina humana inducen la expresión de péptidos de unión a dipeptidos y pepetidos, los cuales son necesarios para la colonización de la vejiga y el riñón (Alteri, et al., 2009). La falta de adaptación de UPEC sometidas a mutaciones dirigidas en rutas de absorción de aminoácidos durante el proceso infeccioso, indica que la fuente primaria de utilización de carbono son los péptidos y aminoácidos (Alteri, et al., 2009). Además, se ha observado en portadores asintomáticos que *E.coli* en la vejiga incrementa la expresión de la enzima D - serina desaminasa y de los transportadores de péptido / aminoácidos en *E.coli* (Zdziarski, et al., 2010). Los aminoácidos gluconeogénicos como la serina pueden degradarse a oxalacetato o a piruvato ingresando a la ruta del ciclo de Krebs que es necesario para proveer sustratos como: citrato, glioxilato, entre otros. Además de los metabolitos de funcionalidad fisiológica para el proceso de colonización bacteriana en el tracto

urinario, se ha puesto en evidencia que proteínas sintetizadas por el huésped para contrarrestar el proceso infeccioso (citoquinas), se ven reprimidas en su expresión por las bacterias para adaptarse y permanecer en el huésped (Klumpp, Weiser, Sengupta, Forrestal, Batler, & Schaeffer, 2001). La membrana celular de las bacterias gram – negativos, como la *E.coli*, presentan receptores para citoquinas proinflamatorias tipo factor de necrosis tumoral (TNF) e Interleucina – 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), las cuales mediante la síntesis de factores de transcripción modifican los mecanismos de virulencia bacteriano como respuesta de unión a estas (Zav'yalov, et al., 1995) (Luo, Niesel, Shaban, Grimm, & Klimpel, 1993). Durante la homeostasis tisular y en respuesta a una injuria, las células coordinan su crecimiento y proliferación con señales autocrinas y paracrinias mediante la síntesis de moléculas de bajo peso molecular llamadas citoquinas (Abbas, Poher, & Lichtman, 1995). Las citoquinas como la IL -  $\beta$ 1 y el TNF -  $\alpha$ , son indispensables para regular el inicio de la respuesta de defensa del hospedero, mediada por los neutrófilos en las ITU. Sin embargo, las UPEC son capaces de suprimir la migración de neutrófilos, reprimiendo la expresión de genes involucrados en la quimiotaxis, señales proinflamatorias, adhesión y migración (Loughman & Hunstad, 2011).

Por otro lado, en la PAM existen cambios metabólicos que generan un estado inflamatorio permanente. Mecanismos que explican este estado están asociados a la desregulación de la secreción hormonal del cortisol (agente anti – inflamatorio), en conjunto a la baja tasa de producción de testosterona, el cual en situaciones de estrés regula los niveles de cortisol protegiendo al individuo de una situación descontrolada de niveles de citoquinas pro – inflamatorias. También, existe evidencia que sugiere que el declinamiento de la función ovárica en la menopausia está asociada con un incremento espontaneo de citoquinas pro – inflamatorias, ya que se estima que los receptores de estrógenos, desembocan una cascada de factores de transcripción que modulan la actividad del óxido nítrico, efectos anti – oxidativos y cambios en la función de las células inmunitarias (Rimbach, & Fuchs, 2005). Además, la alta frecuencia de enfermedades crónicas en adultos mayores también influye en un estado pro – inflamatorio. Y por último, la alta tasa de obesidad

en adultos mayores incrementa el estado pro – inflamatorio, ya que es sabido que los adipocitos son capaces de producir un amplio rango de citoquinas pro – inflamatorias, un índice de masa corporal (IMC)  $\geq 25$  está asociado con incremento en los signos de inflamación que decrecen disminuido el IMC (Rimbach, & Fuchs, 2005).

El estrés oxidativo es crítico en el desarrollo de la respuesta inmunológica ya que limita el desarrollo de agentes infecciosos. En las ITU agudas, la respuesta inmunitaria es de tipo celular y los neutrófilos son el principal linaje celular dirigido contra la invasión de las UPEC (Hayes, B. W., & Abraham, S. N. (2016). Los neutrófilos tienen como principal mecanismo de defensa la producción de sustancias reactivas al oxígeno (ROS), los cuales son generados a partir de enzimas productoras de ROS, como son la mieloperoxidasa y NADPH oxidasa (Ciftci, H., Verit, A., Yeni, E., & Savas, M. 2008) (Abraham, S. N., & Miao, Y, 2015) ( Ciftci, H., Verit, A., Yeni, E., & Savas, M. 2008). Los ROS como el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno o anión superóxido, son subproductos del metabolismo del oxígeno altamente reactivos que generan la desestabilización estructural de las sustancias a las cuales oxidan. En los neutrófilos la producción de ROS determina su capacidad microbicida en la fagocitosis. La capacidad de elución por parte de las UPEC a la fagocitosis neutrofílica conduce a una respuesta desmedida en la síntesis de ROS extracelular, lo cual tiene como efecto inmediato el daño a la célula inmune y a los tejidos periféricos (Hanson, L. Å. (1973). Existe literatura que ha evidenciado la sobreproducción de radicales libres en el curso de las ITU y la depleción de enzimas antioxidantes en respuesta a esta (Kurutas, Ciragil y Gul; 2005). A través del estudio de la capacidad antioxidante total en la orina podremos evaluar la interacción a nivel oxidativo entre las variantes genéticas de UPEC y la respuesta inmune, tomando en consideración su filogenia.

Se ha reportado que los diversos componentes presentes en el ambiente urinario sugieren un rol protagónico en la patogénesis de la ITU. Sin embargo, también es importante tomar en consideración al agente patógeno causante de la ITU el cual

utiliza los metabolitos descritos para producir el estado de infección. Los patógenos bacterianos más comunes causantes de ITU, en residencias geriátricas, según estudios realizados en EE.UU son *E.coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella* y *Providencia*, seguido de bacterias gram positivas, como *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Enterococcus* (Rowe & Juthani-Mehta 2013). Aunque, la *E.coli*, es el patógeno que predomina, causando el 80 – 90% de todos los episodios de ITU (Ejrnæs, 2011). A pesar de reconocer la relevancia de *E.coli* como el principal agente causal de las ITU, hay escasa información respecto a la identidad de la cepa aislada. La biología molecular ha aportado metodologías que permiten alcanzar este fin. El polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Rahav, Pinco, Bachrach, & Bercovier, 2003), ERIC – PCR (Xiu-Yan, Zhang, Jiang, Jiao, & Hong-Bo, 2013) y el Clermont – PCR (Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000) son actualmente algunas de las técnicas que se utilizan.

En relación a la clasificación molecular de *E.coli*, el sistema de colección de referencia de *Escherichia coli* (ECOR), sugiere la utilización de la técnica de agrupamiento filogenético rápido descrita por Clermont y cols (Clermont, et al., 2000), la cual las agrupa en siete grupos (A, B1, B2, C, D, E y F). En pacientes residentes en CRG con ITU por *E.coli* se ha encontrado que el grupo clonal B2 fue el más frecuente (Pobiega, et al., 2013), así como también lo es en el tracto intestinal (Nowrouzian, Wold, & Adlerberth, 2005) (Nowrouzian, Adlerberth, & Wold, 2006).

Finalmente, existe una asociación entre los diversos mecanismos de virulencia y determinados grupos filogenéticos de UPEC. El grupo filogenético B2 ha sido identificado como el de mayor patogenicidad ya tiene mayor capacidad en albergar genes de virulencia como: fimbriae A (adhesión a células del urotelio), S fimbriae (*sfa*), factor citológico necrotizante 1 (*cnf1*) (factor citotóxico), entre otros (Tramuta, Nucera, Robino, Salvarani, & Nebbia, 2011) (Sabaté, Moreno, Pérez, Andreu, & Prats, 2006). Sin embargo, la relación entre la fisiología bacteriana y determinados grupos filogenéticos no está definida. Por ello, nos parece relevante ampliar los estudios, investigando la relación de los factores urinarios descritos (hierro, IL-1,



TNF - alfa, vitamina B12 y capacidad antioxidante total), y los grupos filogenéticos en UPEC para aproximarnos a describir, sus características fisiológicas y sustentar la base de futuras investigaciones que permitan modelar nuevos enfoques terapéuticos para reducir la prevalencia de ITU en PAM.

## 2.2 Bases teóricas

Los principales mecanismos del proceso infeccioso bacteriano en el tracto urinario, comprenden factores de virulencia como: la síntesis de toxinas, la elaboración de adhesinas, mecanismos de movilidad, sistemas de adquisición de hierro y los mecanismos que evaden tanto la inmunidad innata como la adaptativa, determinantes en la adquisición de ITU (Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008). No se ha evidenciado un mecanismo dominante que sea compartido por todas las UPEC y que al mismo tiempo no sea compartido por bacterias comensales no patógenas (Alteri, & Mobley, 2015). Por lo que, actualmente, la relevancia del metabolismo bacteriano durante el proceso infeccioso se ha postulado como un factor clave para el proceso infeccioso, habiéndose propuesto que la habilidad para sobrevivir en el tracto urinario depende tanto de la fisiología bacteriana como de los mecanismos de virulencia descritos previamente (Alteri, Smith, & Mobley, 2009).

La *E.coli*, presenta cinco grupos filogenéticos, según la clasificación de Clermont, las cuales tienen una distribución heterogénea en el tracto urinario, siendo determinante la capacidad de utilización y evasión de los inmunometabolitos presentes en la orina para su supervivencia (Pobiega, et al., 2013) (Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000). El ambiente urinario de la vejiga, presenta características ambientales distintas al tracto intestinal, con una composición fisicoquímica estéril (Snyder, et al., 2004), en particular, la alta osmolaridad y la moderada presencia de oxígeno (Brooks, & Keevil, 1997) (Alteri, & Mobley, 2007),

por lo que se ha observado que los aminoácidos, hierro, entre otros son fuente principal de alimento para la *E.coli*, durante la ITU (Alteri, et al. 2009).

## 2.3 Marco Conceptual

- ❖ BtuB.- Receptor de membrana externa de la cobalamina.
- ❖ CAO.- Capacidad antioxidante de la orina.
- ❖ CRG.- Centro de residencia geriátrico.
- ❖ Grupo filogenético – *E.coli*.- Siete variantes clonales de *E.coli*: A,B1,B2,C,D,E y F descritas por Clermont y cols.
- ❖ IL – 1 $\beta$ .- Interleucina-1-beta.
- ❖ INEI.- Instituto Nacional de Estadística e Informática.
- ❖ ITU.- Infección del tracto urinario.
- ❖ Marcadores inmunometabólicos.- Analitos excretados en la orina y que guardan una relación importante en el metabolismo celular bacteriano e inmunológico.
- ❖ MetH.- Metionina sintasa cobalamina – dependiente.
- ❖ PAM.- Población adulta mayor.
- ❖ ROS.- Sustancias reactivas al oxígeno.

- ❖ TNF –  $\alpha$ .- Factor de necrosis tumoral alfa.
- ❖ UPEC.- *Escherichia coli* uropatógena.

## CAPITULO III: METODOLOGÍA

Las muestras urinarias fueron proporcionadas por el laboratorio Medical Prevention y analizadas en la Universidad de Piura y el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM. La recolección de las muestras se realizó desde el 24 marzo al 12 de octubre del año 2018. Las muestras de orina fueron refrigeradas (4 - 8°C), inmediatamente, una vez recolectadas. En la siguiente tabla se observa el número de muestras recolectadas por las CRG y los aislamientos positivos a *E.coli* por CRG.

Tabla 1

*Distribución de muestras según casa de reposo*

Casa de reposo	Número de muestras	Nº Orinas con <i>E.coli</i>
“A”	27	7
“B”	9	1
“C”	49	10
“D”	10	2
“E”	11	5

### 3.1. Tipo y diseño de la investigación

El estudio se puede definir como analítico de tipo correlacional.

### 3.2. Unidad de análisis

Muestras urinarias con *Escherichia coli* de pacientes adultos mayores residentes en centros gerontológicos.

### 3.3. Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño muestral se determinó en base a un estudio piloto de diez personas adultas mayores con ITU, en el cual se midió la concentración del TNF –  $\alpha$ . Con el valor obtenido se determinó la desviación estándar del TNF –  $\alpha$ , el cual se incluyó en la siguiente fórmula para el cálculo del tamaño muestral con la finalidad de obtener la comparación entre las medias de estudio (PAM con ITU por *E.coli* – B2 positivo v.s PAM con ITU por *E.coli* – B2 negativo\*).

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

\*El grupo B2 negativo incluye a los grupos filogenéticos: A, B1, C, D, E.

El cálculo del tamaño muestral se realizó tomando en consideración las siguientes características:

- Nivel de confianza: 95% (z=1.960)
- Potencia: 80% (z=0.842)
- Desviación estándar del TNF –  $\alpha$ : 3.76 pg/mL
- Valor mínimo de la diferencia a detectar: 3.74 pg/mL

Por lo tanto, cada grupo de estudio estuvo conformado por 12 muestras de orina.

### **3.4. Población de estudio**

Muestras de orina de adultos mayores residentes en centros gerontológicos de la provincia de Lima.

### **3.5. Selección de la muestra**

#### ***3.5.1 Criterios de inclusión***

- Residir en un centro gerontológico.

#### ***3.5.2 Criterios de exclusión***

- Presencia de urostomía.
- Pacientes terminalmente enfermos.
- Pacientes con hemodiálisis en el transcurso del proyecto.
- Excretar glucosa al momento de recolección de la orina.
- Crecimiento polimicrobiano.

### **3.6. Técnicas de recolección de datos**

Las muestras fueron transportadas al laboratorio Medical Prevention (MP) en un recipiente refrigerado a 4 – 8°C. En el laboratorio las muestras fueron distribuidas en tres frascos cónicos estériles de 15 mL. En dos de los frascos cónicos se almacenaron 5mL de orina y se congelaron a -20°C, hasta el momento de su

análisis. El tercer frasco cónico se utilizó para realizar el examen completo de orina y cultivo microbiológico.

### ***3.6.1 Examen completo de orina***

Se centrifugó en un tubo cónico de 15mL, 10mL de orina previamente homogenizada. Se realizó el examen químico con las tiras reactivas de orina Urit 11V (Urit Medical Electronic), según las especificaciones del fabricante. La orina, posteriormente fue centrifugada a 400g durante 5 minutos. El sobrenadante fue decantado, hasta remover 9.5mL. Posteriormente, para la lectura microscópica del sedimento urinario, se depositó 20uL del sedimento en una lámina portaobjeto, previa homogenización, y se procedió a su lectura, siguiendo las recomendaciones descritas en el documento técnico para laboratorios clínicos elaborado por el Instituto de Salud de Chile (Lagos & Pinto, 2013).

### ***3.6.2 Cultivo microbiológico***

Las orinas que presentaron un recuento de Leucocitos  $> 5/\text{campo}$  y/o más de 2+ de gérmenes, se sembraron en Agar McConkey y Agar Sangre (Marca, Oxoid) por estría en placa con un asa calibrada de 1uL. Los cultivos fueron incubados a 37°C, durante 24 horas. Luego de los cuales se analizó el crecimiento bacteriano; los cultivos con un recuento mayor a 100,000 UFC/mL en el Agar Sangre y lactosa positiva en el agar McConkey fueron investigados con medios de cultivo diferencial para determinar el género y especie bacteriana.

### ***3.6.3 Identificación bacteriana***

Se utilizaron los medios diferenciales: Agar Hierro Triple (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA), Agar Movilidad – Indol – Ornitina (MIO) y Citrato, todos de la marca, Oxoid. Luego del cultivo en los agares diferentes, durante 24 horas a 37°C, fueron

consideradas *Escherichia coli*, las bacterias que en los medios diferenciales tuvieron el siguiente patrón de identificación.

TSI				LIA				MIO			Citrato
GAS	S	P	SH2	GAS	S	P	SH2	M	I	O	
+/-	A/K	A	-	+/-	A/K	A	-	+	+	+	-

Posteriormente, las *E.coli*, fueron almacenadas en Agar Tripticasa de Soya (TSA) (Oxoid), incubadas durante 24 horas a 37°C y finalmente almacenadas a 4°C, para la extracción genómica.

### 3.6.4 Extracción de ADN

En el proceso de extracción de ADN bacteriano se utilizó el DNA Purification kit GeneJet Genomic, Thermo Scientific (se siguió el protocolo sugerido por la casa comercial).

Las *E.coli* cultivadas en el caldo Luria Bertani (LB), durante 24 horas, fueron centrifugadas por 5 minutos a 2,100rpm (250g). Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con buffer fosfato salino (PBS), con la finalidad de eliminar residuos del medio de cultivo. El procedimiento se repitió una segunda vez y se descartó el sobrenadante. Posteriormente el sedimento bacteriano fue resuspendido con 200uL del buffer PBS; se adicionó 200uL de la solución de lisis y 20uL de la enzima proteinasa K. Los viales fueron agitados con la ayuda de un vórtex durante 10 segundos cada vez, hasta obtener una suspensión uniforme. Las muestras fueron incubadas a 56°C, agitándolas con ayuda del vórtex cada 3 minutos hasta los 10 minutos, donde se completó la lisis celular. A continuación, se adicionó 400uL de etanol al 50% y se homogenizó la suspensión, utilizando, nuevamente, el vórtex. Luego, el lisado celular se transfirió a una columna de purificación GeneJET Genomic DNA. Se centrifugó las columnas durante 1 minuto a 10,300rpm (6,000g). Se descartó el tubo de colección conteniendo el fluido eluido. Se colocó la columna



de purificación GeneJET Genomic DNA en un tubo de colección de 2mL. Las columnas de purificación fueron embebidas con 500uL de la solución de lavado I (resuspendida en etanol). Se centrifugó durante 1 minuto a 12,000rpm (8,000g). Se descartó el fluido eluido y se colocó la columna de purificación, nuevamente, en el tubo de colección.

Posteriormente, se adicionó 500uL de la solución de lavado II (resuspendida en etanol), a la columna de purificación GeneJET Genomic DNA. Se centrifugó durante 3 minutos a 14,600rpm (12,000g). Finalmente, se adicionó 200uL del buffer de elución a la columna de purificación para eluir el ADN genómico, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 1 minuto a 12,000g (8,000g).

Las columnas de purificación fueron descartadas y el ADN eluido fue refrigerado a -20°C para su posterior análisis. Se realizó la cuantificación del ADN extraído en cada uno de las cepas bacterianas.

### ***3.6.5 Determinación filogenética***

Los primers utilizados para la realización del PCR – cuádruplex fueron los siguientes: ArpA1, TspE4C2, yjaA y chuA, los cuales fueron de la marca Thermo Fisher. Los primers fueron alicuotados y diluidos a una concentración de 100pmol/uL, utilizados como solución madre y congelados para su posterior uso. En la tabla 2 se describe para mayor detalle

Tabla 2

*Primers y Concentración - Clermont PCR*

Primer	Secuencia (5' – 3')	Concentración (pg/mL)
ArpA1.r	TCT CCC CAT ACC GTA CGC TA	20
AceK.f	AAC GCT ATT CGC CAG CTT GC	20
TspE4C2.2b	AGT TTA TCG CTG CGG GTC GC	20
TspE4C2.1b	CAC TAT TCG TAA GGT CAT CC	20
yjaA.2B	AAT GCC TTC CTC AAC CTG TG	20
yjaA.1B	CAA ACG TGA AGT GTC AGG AG	20
chuA.1b	ATG GTA CCG GAC GAA CCA AC	20
chuA.2	TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	20

Las condiciones del PCR fueron tomadas según lo descrito por Clermont y cols. Todas las reacciones del PCR - cuádruplex fueron llevadas a cabo con un volumen final de 19.1uL conteniendo: 15uL del Platinum super mix, 0.4uL de cada uno de los primers chuA1.r, chuA1.f, TspE4C2.2b, TspE4C2.1b, yjaA.2B, yjaA.1B y 0.6uL del primer ArpA1.r y AceK.f. Adicionalmente el volumen de ADN incorporado fue de 0.5uL.

Las condiciones de ciclaje se ensayaron según las condiciones descritas por Clermont (Clermont, 2000):

Tabla 3

*Condiciones de ciclaje PCR - Clermont*

Estados de ciclación	Tiempo	Temperatura (°C)
Denaturación inicial	4 minutos	94
Denaturación	5 segundos	94
Alineamiento	20 segundos	59
Extensión final	5 minutos	72

Nota.- Se realizaron 30 ciclos de reacción

### **3.6.6 Determinación del hierro total**

La determinación de hierro en orina fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial Sigma – Aldrich.

En la preparación de los estándares, se diluyó 10uL de los 100mM del hierro estándar (SE), con 990uL de agua bidestilada para obtener una concentración final de 1mM de SE. Luego se realizaron diluciones seriadas, adicionando 10, 8, 6, 4, 2, 0 uL de la SE a cada pocillo de reacción para obtener concentraciones estándar de: 10, 8, 6, 4, 2, 0 nmoles / pocillo, respectivamente. Posteriormente, se completó todos los pocillos con 90uL del Buffer Iron Assay. Finalmente se adicionó 5uL del Iron Reducer a cada pocillo de reacción. Para la preparación de los sobrenadantes urinarios se diluyó el sobrenadante 9:10, con el Buffer Iron Assay hasta obtener un volumen de 100uL en el pocillo de reacción. Seguidamente, a todas las muestras se les adicionó 5uL del Iron Reducer en cada pocillo. Se pipeteó la reacción 10 veces / pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Terminado el periodo de incubación se adicionó 100uL del Iron Probe a cada pocillo, se pipeteó la reacción 10 veces / pocillo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La placa se protegió de la luz durante todo el periodo de incubación. Finalizada la incubación se leyó a 593nm en el espectrofotómetro Multiskan Go, Thermo Scientific, inmediatamente. Todas las mediciones fueron realizadas por duplicado y restadas al blanco.

El cálculo de la concentración de hierro se realizó, utilizando el siguiente procedimiento:

- Cantidad de hierro = 5.84 nmoles (derivado de la curva estándar)  
Volumen de la muestra (Sv) = 20  $\mu$ L
- Concentración del hierro en la Muestra problema:  

$$5.84 \text{ nmoles} / 20 \mu\text{L} = 0.292 \text{ nmoles} / \mu\text{L}$$

$$0.292 \text{ nmoles} / \mu\text{L} \times 55.85 \text{ ng/nmoles} = 51.38 \text{ ng} / \mu\text{L}$$

En la Tabla 4 se muestran los valores de absorbancia obtenidos de los puntos de calibración; a partir de los cuales se realizó una curva de calibración con un coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) de 0.998, Gráfico 1.

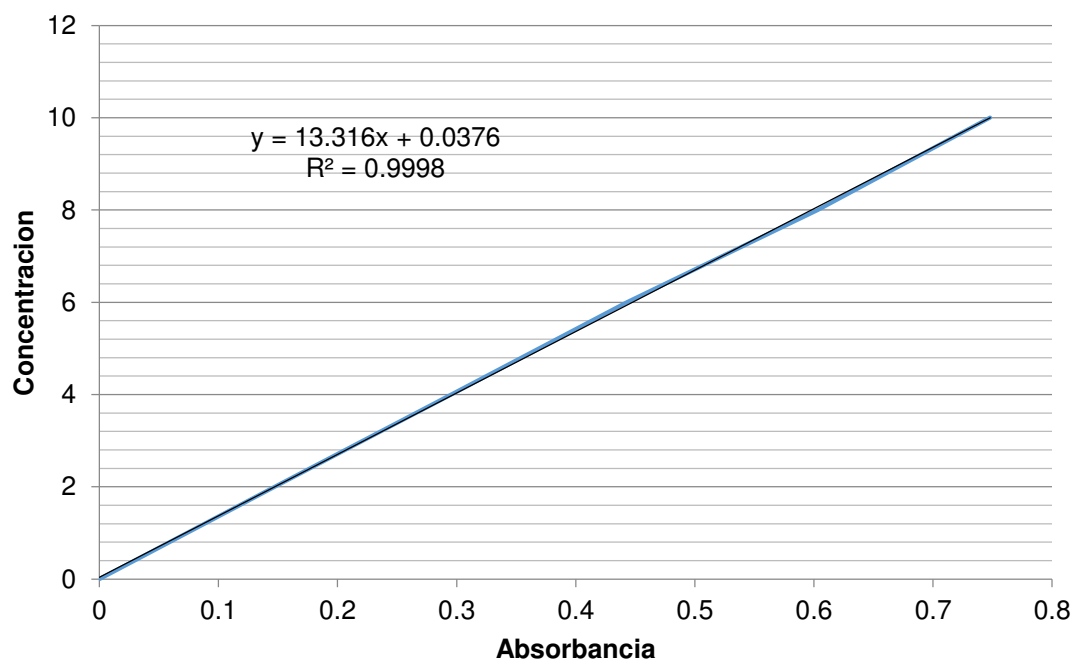
Tabla 4

*Resultados curva de estandarización hierro*

Concentraciones	Absorbancia promedio	$Ab_1 - Ab_{\text{blanco}}$	Concentraciones (ug/L)
0	0.045	0	0
2	0.192	0.147	2
4	0.34	0.295	4
6	0.488	0.443	6
8	0.648	0.603	8
10	0.793	0.748	10

Gráfico 1

*Curva de calibración hierro*



La elaboración de la curva de calibración nos permitió determinar las concentraciones de hierro en la orina de los pacientes en el estudio.

### **3.6.7 Determinación de IL1- beta**

La determinación de IL1 – beta fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial Sigma – Aldrich.

Los reactivos fueron llevados a temperatura ambiente. Posteriormente, se preparó el buffer diluyente de muestra B, diluyéndolo 1:5 con agua bidestilada, el cual fue utilizado para diluir los sobrenadantes urinarios 1:2. Paralelamente, se realizaron diluciones seriadas al estándar, el cual presentó una concentración inicial de 20ng/mL. Se realizaron siete diluciones hasta obtener una concentración final de 0,48 pg/mL. La dilución del estándar tenía como finalidad elaborar la curva de calibración. Luego, se adicionó 100uL de cada estándar y muestra al pocillo correspondiente, por duplicado. Se cubrieron los pocillos y se incubaron durante 2.5 horas a temperatura ambiente en agitación leve. Posteriormente, se desechó la solución de los pocillos y se lavó 4 veces con la solución de lavado, utilizando 300uL de la solución de lavado cada vez. Se secaron los pocillos, vigorosamente, con papel toalla. Seguidamente, se adicionó 100uL de la solución preparada 1X del anticuerpo de detección biotinado a cada pocillo, se incubó durante 1 hora, a temperatura ambiente, en agitación leve. Los anticuerpos de detección biotinilados fueron homogenizados por centrifugación a 13,000g previamente antes de usar; terminado el tiempo de incubación se descartó la solución y se repitió el lavado según lo descrito previamente.

Finalmente se adicionó 100uL de la solución preparada HRP – estreptovidina a cada pocillo, se incubó durante 45 minutos, a temperatura ambiente, en agitación leve. La solución se descartó y se repitió el lavado descrito previamente. Se adicionó 100uL del reactivo colorimétrico TMB a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, en agitación leve. La reacción fue detenida adicionado 50uL de la solución stop a cada pocillo. Los pocillos fueron leídos en el espectrofotómetro Multiskan Go, Thermo Scientific, a 450nm inmediatamente. El

cálculo de las absorbancias, por duplicado, se promedió, tanto de los estándares como de los controles y muestras.

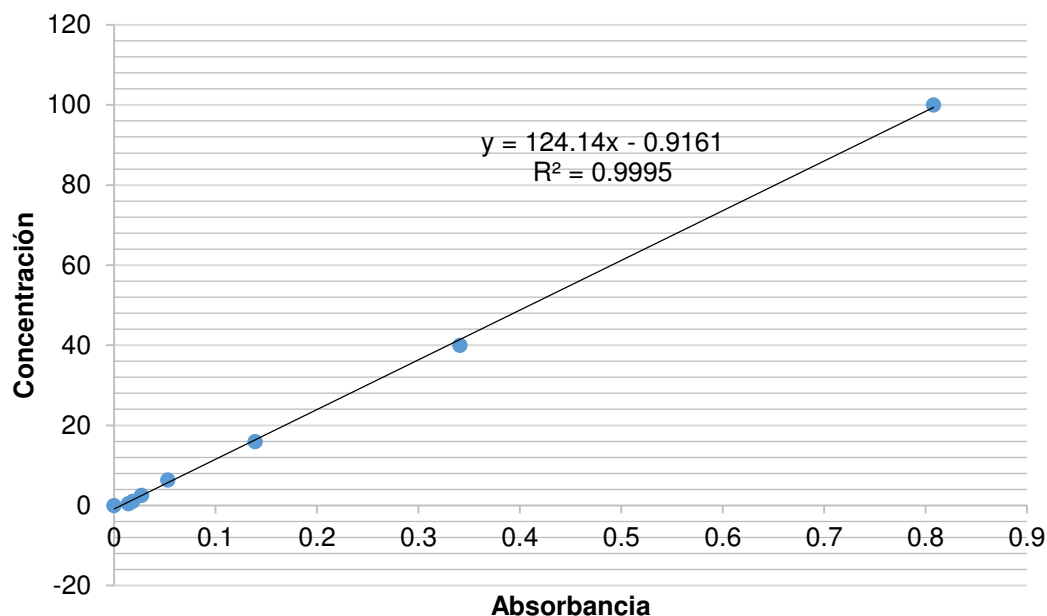
Se realizó una curva de calibración estándar; los resultados de absorbancia se muestran en la Tabla 5. Posteriormente, se elaboró una curva de calibración con los resultados obtenidos y se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) de 0.9995, Gráfico 2.

Tabla 5

*Resultados absorbancia - curva de estandarización IL-1 $\beta$*

Concentración	Absorbancia (promedio)	$Ab_{Mx} - Ab_{Blanco}$
100	0.927	0.808
40	0.46	0.341
16	0.258	0.139
6.4	0.172	0.053
2.56	0.146	0.027
1.02	0.137	0.018
0.48	0.133	0.014
0	0.119	0

Gráfico 2  
Curva de calibración IL -  $1\beta$



### 3.6.8 Determinación de TNF - alfa urinaria

La determinación del TNF - alfa fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial Sigma – Aldrich. La metodología utilizada fue de tipo ELISA directo.

Los reactivos fueron llevados a temperatura ambiente. Posteriormente, se preparó el buffer diluyente de muestra B, diluyéndolo 1:20 con agua bidestilada, el cual fue utilizado para diluir los sobrenadantes urinarios 1:1. Paralelamente, se realizaron diluciones seriadas al estándar, el cual presentó una concentración inicial de 60 ng/mL. Se realizaron siete diluciones hasta obtener una concentración final de 24.58 pg/mL. La dilución del estándar tenía como finalidad elaborar la curva de calibración.

Luego, se adicionó 100uL de cada estándar y muestra al pocillo correspondiente, por duplicado. Se cubrieron los pocillos y se incubaron durante 2.5 horas a temperatura ambiente en agitación leve. Luego de los cuales se desechó la solución de los pocillos y se lavó 4 veces con la solución de lavado, utilizando 300uL de la

solución de lavado cada vez. Se secaron los pocillos, vigorosamente, con papel toalla. Seguidamente, se adicionó 100uL de la solución preparada 1X del anticuerpo de detección biotinado a cada pocillo, se incubó durante 1 hora, a temperatura ambiente, en agitación leve. Los anticuerpos de detección biotinilados fueron homogenizados por centrifugación a 14,000rpm previamente antes de usar, terminado el tiempo de incubación se descartó la solución y se repitió el lavado según lo descrito previamente.

Finalmente se adicionó 100uL de la solución preparada HRP – estreptovidina a cada pocillo, se incubó durante 45 minutos, a temperatura ambiente, en agitación leve. La solución se descartó y se repitió el lavado descrito previamente. Se adicionó 100uL del reactivo colorimétrico TMB a cada pocillo, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, en agitación leve. La reacción fue detenida adicionado 50uL de la solución stop a cada pocillo. Los pocillos fueron leídos en el espectrofotómetro Multiskan Go, Thermo Scientific, a 450nm inmediatamente. El cálculo de las absorbancias, por duplicado, se promedió, tanto de los estándares como de los controles y muestras.

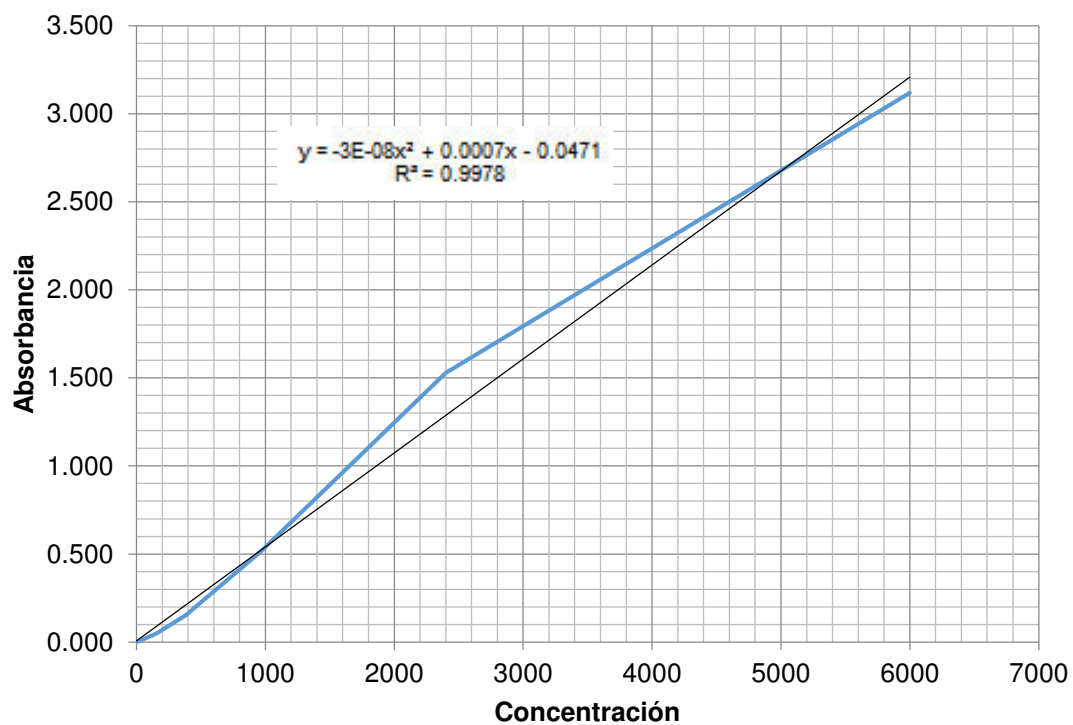
Se realizó una curva de calibración estándar obteniendo los siguientes resultados de absorbancia, mostrados en la Tabla 6, Los resultados se tradujeron en una curva de calibración, obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) de 0.997, Gráfico 3.



Tabla 6  
Resultados curva de estandarización TNF –  $\alpha$

Concentraciones (pg/mL)	Abs1	Abs2	Promedio Abs	Abs <sub>mx</sub> - Abs <sub>blanco</sub>
0	0.058	0.053	0.0555	0
24.58	0.061	0.06	0.0605	0.005
61.44	0.071	0.077	0.074	0.019
153.6	0.105	0.101	0.103	0.048
384	0.202	0.215	0.2085	0.153
960	0.547	0.585	0.566	0.511
2400	1.572	1.595	1.5835	1.528
6000	3.199	3.152	3.1755	3.12

Gráfico 3  
Curva de calibración TNF –  $\alpha$



### 3.6.9 2,2-azinobis-[3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS)

Este ensayo se basa en la oxidación del ABTS por el  $K_2S_2O_8$ , lo cual forma el radical catión estable ABTS\*. Este radical sirve para evaluar la capacidad antioxidante de moléculas o compuestos en ensayos basados en la transferencia de electrones. La molécula presenta un pico de absorción a 734 nm. La adición de antioxidantes al radical preformado, el cual es de color verde, lo reduce a ABTS decolorándolo en el proceso, de modo que el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del ABTS\* es determinado por la concentración y el tiempo (Suarez, 2014).

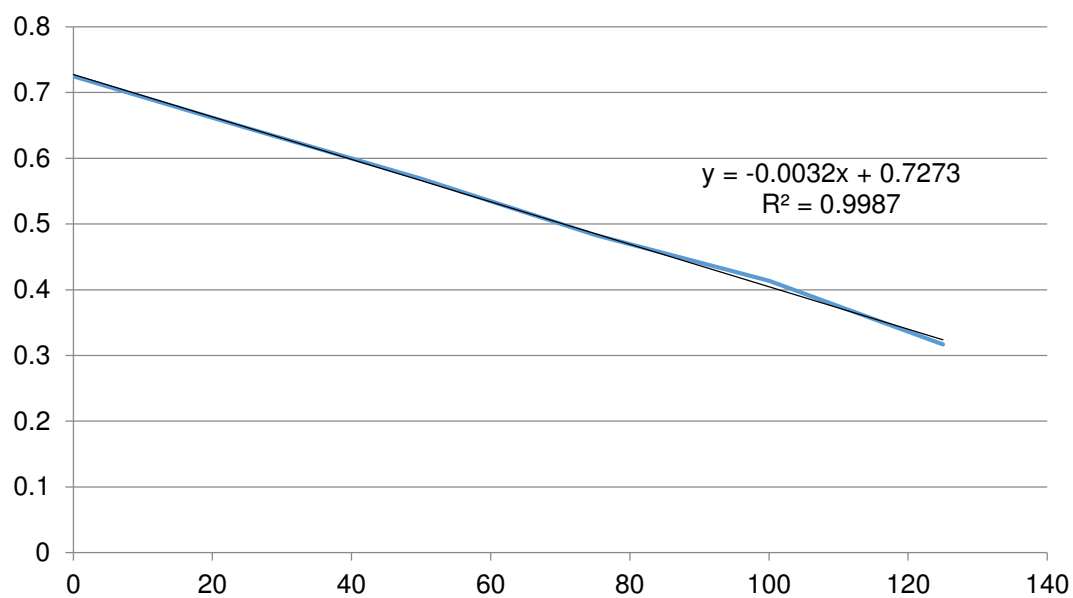
El volumen de reactivo de trabajo utilizado fue de 190uL y 10 uL del sobrenadante urinario. Se incubó durante 7 minutos en oscuridad y se procedió a hacer la lectura a 734nm en el espectrofotómetro Multiskan Go, Thermo Scientific. Se ensayaron distintas diluciones de orina, siendo la de 1:15 la que se adecuó mejor a la curva de calibración elaborada. Se realizó una curva de calibración estándar, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia, mostrados en la Tabla 7, la cual se tradujo en una curva de calibración, con un coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) de 0.9987, Gráfico 4.

Tabla 7

*Resultados curva de estandarización ABTS*

Concentración (ug/mL)	Abs1	Ab2	Abs Promedio
0	0.724	0.726	0.725
25	0.644	0.648	0.646
50	0.567	0.571	0.569
75	0.483	0.484	0.4835
100	0.415	0.412	0.4135
125	0.317	0.317	0.317

Gráfico 4  
*Curva de calibración ABTS*



### 3.6.10 Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Este ensayo evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) presente en un complejo con el 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) hasta su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ) que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590- 595 nm.

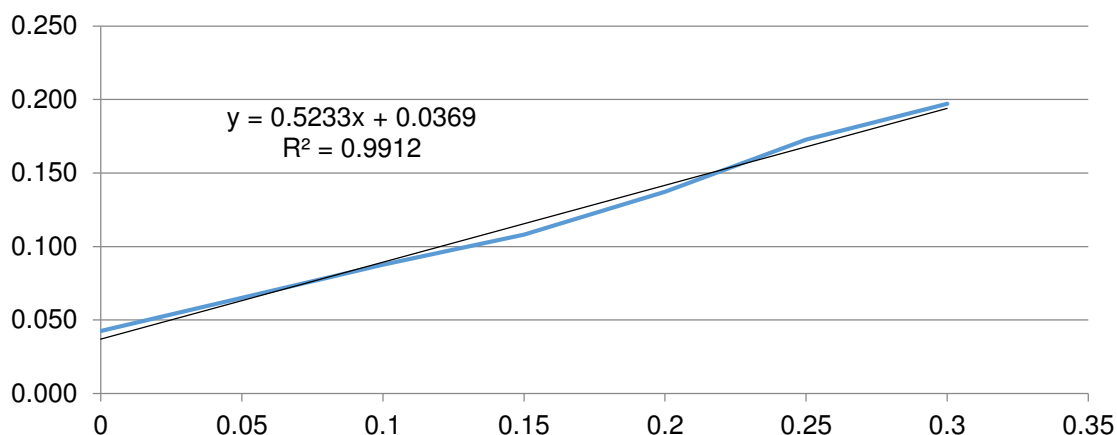
El ensayo se llevó a cabo en un buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), que contiene TPTZ y  $\text{FeCl}_3$ , en una proporción de 98:1:1. Los volúmenes utilizados para cada reacción fueron de 95uL del reactivo de trabajo y 5uL del sobrenadante de la orina. Luego de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente con la muestra problema se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en el espectrofotómetro Multiskan Go, Thermo Scientific. La curva de referencia se construyó usando al ácido ascórbico como sustancia patrón. Se ensayaron distintas diluciones de orina, siendo la de 1:3 la que se adecuó mejor a la curva de calibración elaborada. Finalmente, se realizó una curva de calibración estándar, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia, mostrados en la Tabla 8, la cual se tradujo en una curva de calibración, con un coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) de 0.9912, Gráfico 5.

Tabla 8

#### *Resultados curva de estandarización FRAP*

Concentración mM	Abs1	Ab2	Abs Promedio
0	0.043	0.042	0.042
0.1	0.086	0.089	0.088
0.15	0.106	0.11	0.108
0.2	0.136	0.138	0.137
0.25	0.172	0.173	0.173
0.3	0.193	0.202	0.197

Gráfico 5

*Curva de calibración FRAP***3.6.11 Determinación de Vitamina B12**

La medición urinaria de vitamina B12 fue cuantificada por medio de un procedimiento tipo sándwich, directo tipo ELISA, provisto por la casa comercial Accubind. El ELISA – Vit B12, diseñado para la cuantificación de vitamina B12 en sangre, se ensayó para ser validado en el fluido urinario, tomando en consideración el porcentaje de recuperación del analito, la reproducibilidad y el límite de detección; sin embargo no pudo ser validado para este propósito.

**3.7. Consideración ética**

Se respetó la confidencialidad del contenido de la historia clínica, así como el de los resultados. Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética en investigación del Instituto de Ética en Salud de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Acta N°1812 con código de proyecto N° 0013.

### 3.8. Análisis e interpretación de la información

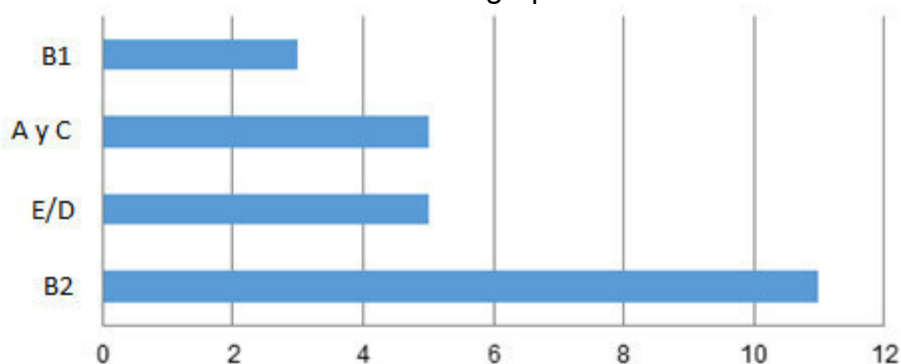
Los datos son presentados en frecuencias, en tablas; fueron analizadas las medias de los inmunometabolitos cuantificados en los dos grupos de estudio (PAM con ITU por *E.coli* – B2 positivo v.s PAM con ITU por *E.coli* – B2 negativo), utilizando la prueba estadística “t” de Student, un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo. Además, se incluyó la medición de inmunometabolitos cuantificados de PAM sin ITU, como control “blanco”, con la intención de evidenciar una diferencia en la respuesta de los pacientes con ITU y sin ITU. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 20 para Windows Xp.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Distribución filogenética *E.coli*

Se encontraron 11 variantes filogenéticas de *E. coli* tipo B2 y 13 no-B2, agrupadas en A, B1, C, D, E y F. La frecuencia de distribución clonal se muestra en el Gráfico 6.

Gráfico 6  
Frecuencia de *Escherichia coli* vs grupo clonal



### Hierro en orina

La concentración media de hierro en pacientes adultos mayores sin ITU fue de 67.4 ug/L y con ITU fue de 175.4 ug/L, 2.6 veces más que en pacientes sin ITU ( $p=0.001$ ). Estos resultados evidencian un efecto propio de la ITU. A continuación, se muestran los resultados de hierro en orina de los pacientes con ITU y sin ITU, Tabla 9.

Tabla 9

*Resultados de hierro en orina de pacientes con ITU y sin ITU*

Concentración	Número	$\bar{X}$ Hierro (ug/L)	Desviación estándar	Valor p
Con ITU	24	175,4	133,75	0.001
Sin ITU	17	67,4	24,82	

El hierro, es un elemento indispensable en el metabolismo bacteriano (Vigil, et al. 2011), se han descrito diversos mecanismos de captación, los cuales son variados, redundantes y heterogéneos en su patrón de expresión ante el proceso de ITU (Garcia, Brumbaugh, Moble, 2011). En modelos murinos infectados con *M.tuberculosis* la suplementación con hierro resultó en un aumento de 10 veces las UFC comparado con ratones no suplementados (Schaible, Collins, Priem, Kaufmann, 2002). En la ITU se ha reportado, además, el aumento en la expresión de los sistemas captadores de hierro (Hagan, Lloyd, Rasko, Faerber, & Mobley, 2010). Por otro lado, la restricción del hierro es un mecanismo de defensa del hospedero que limita la sobrevivencia bacteriana (Bullen, 1981).

### Prueba de hipótesis

Hipótesis nula. - La concentración de hierro en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es igual a la concentración de hierro con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

Hipótesis alternativa. - La concentración de hierro en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es estadísticamente diferente a la concentración de hierro con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

En los resultados obtenidos de pacientes con ITU, la concentración de hierro en los pacientes con *E.coli* - B2 fue mayor que la del resto de grupos, aunque no hubo diferencia significativa entre ellos ( $p = 0.316$ ). En la tabla 10 se muestra la relación



de la concentración de hierro en orina de las *E.coli* del grupo filogenético B2 y demás grupos filogenéticos.

Tabla 10

*Resultados de hierro en orina v.s grupos filogenéticos E.coli*

Grupos filogenéticos	Número	$\bar{X}$ Hierro (ug/L)	Desviación estándar	Valor p
Grupo B2	11	193,48	43,95	0,316
Grupo A,B1,C,D,E	13	160,12	30,67	

A pesar de no haber encontrado diferencia significativa entre los grupos filogenéticos, se observa una tendencia en el grupo *E.coli* - B2 de presentar una mayor concentración de hierro en orina, lo cual guarda coherencia con la presencia de un mayor número de factores de virulencia descritos en el grupo clonal B2. A través de la expresión del factor citotóxico y/o hemolisina, entre otros, se realizan procesos líticos celulares, vertiendo, al medio extracelular, el hierro almacenado en ellas (Burman, 2003) (Moulin-Schouleur, 2006).

También hay que tomar en consideración que en la PAM se ha reportado un aumento en la filtración glomerular de hierro (Pfrimer, Micheletto, Marchini, Padovan, Moriguti, Ferriolli, 2014), lo cual puede ser considerado un factor de riesgo para la adquisición de ITU.

### ***IL - 1 $\beta$ en orina***

Las UPEC, luego de colonizar la uretra tienen como principal objetivo migrar a la vejiga y adentrarse a las células que la revisten. La vejiga al ser el ambiente de almacenamiento de la orina y por lo tanto de nutrientes, se postula como el lugar de colonización bacteriana por largos periodos de tiempo. Las UPEC incorporadas a las células superficiales de la vejiga logran inhibirse de la respuesta inmune ejercida por el hospedero, generando comunidades bacterianas intracelulares (CBI) y luego

comunidades bacterianas quiescentes (CBQ), en las células de revestimiento más profundas (Theodoros, 2011).

La IL - 1 $\beta$  presenta un rol trascendente en la respuesta inmunológica del hospedero frente a la ITU (Waldhuber, Puthia, Wieser, Cirl, Dürr, Neumann-Pfeifer & Schubert, 2016), sintetizándose en los primeros momentos de la infección. La IL - 1 $\beta$  tiene un rol quimiotáctico, a través del estímulo en la producción de la IL- 8 y activador de neutrófilos, por medio del estímulo de los monocitos, células endoteliales y células mesangiales (Ko, et al., 1993).

### **Prueba de hipótesis**

Hipótesis nula. - La concentración de IL - 1 $\beta$  en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es igual a la concentración de IL - 1 $\beta$  con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

Hipótesis alternativa. - La concentración de IL - 1 $\beta$  en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es estadísticamente diferente a la concentración de IL - 1 $\beta$  con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

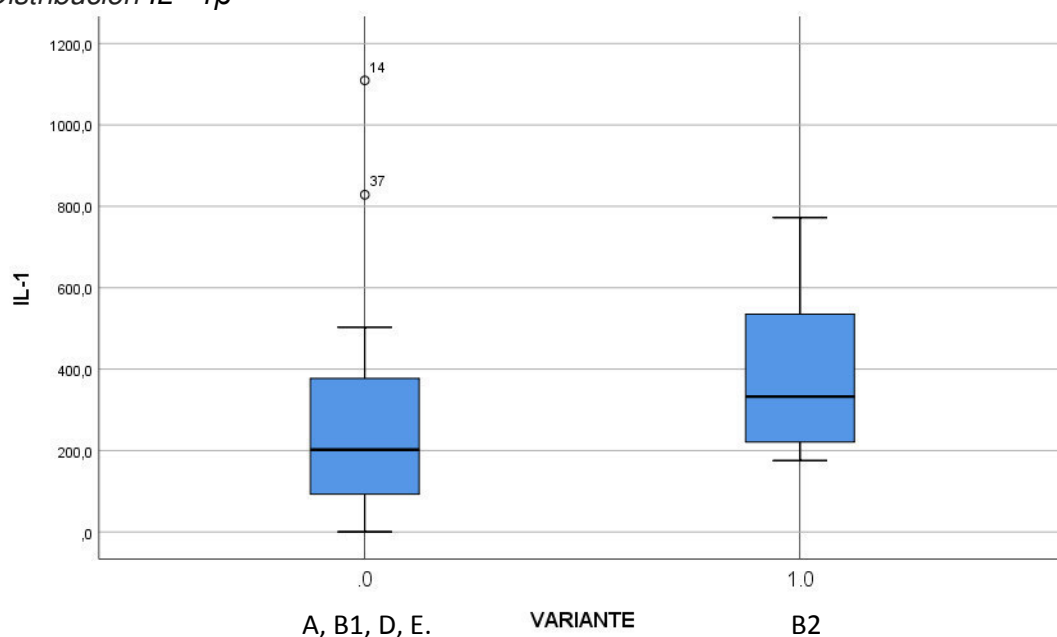
En el planteamiento del proyecto consideramos relevante establecer la relación de su concentración frente a las diversas clonas de *E.coli*, ya que su expresión es crucial en el destino de las UPEC. En el análisis estadístico, t - student, relacionamos la concentración de IL - 1 $\beta$  de los pacientes que presentaban las variantes UPEC tipo B2 frente al resto de variantes agrupadas, mostrándose en la Tabla 8. En los resultados obtenidos no encontramos en forma significativa una diferencia estadística ( $p=0.245$ ). Aunque, se pudo evidenciar una tendencia en los pacientes con la variante de tipo B2 en presentar una mayor concentración de IL - 1 $\beta$  (386,964 vs 294,799 pg/mL), Gráfico 7.

Tabla 11

*Concentración de IL - 1 $\beta$  en orina v.s grupos filogenéticos E.coli*

Grupos filogenéticos <i>E.coli</i>	Número	$\bar{X}$ IL - 1 $\beta$ (pg/mL)	Desviación estándar	Valor p
Grupo B2	11	386,96	61,35	0,245
Grupo A,B1,D,E	13	294,79	93,77	

Gráfico 7

*Distribución IL - 1 $\beta$* 

Es coherente la tendencia, en los pacientes con las variantes de tipo *E.coli* - B2 , de tener una mayor concentración de IL - 1 $\beta$ , debido a que esta variante es la más virulenta (Picard, et al., 1999), induciendo con mayor potencia una respuesta inmunológica (Davidoff, Yamaguchi, Leach, Park, & Lad, 1997).

Por otro lado, estudios previos han evaluado la concentración de IL - 1 $\beta$  en orina de pacientes con ITU, llegando a resultados contradictorios. Mientras algunos estudios encuentran una elevación en la orina de la IL - 1 $\beta$  (Davidoff, Yamaguchi, Leach, Park, & Lad, 1997) (Martins, Darlin, Lad, & Zimmern, 1994), otros no (Ko et

al., 1993). Nosotros, no pudimos evaluar la concentración de IL - 1 $\beta$ , en pacientes sin ITU, sin embargo, la media de los valores obtenidos de IL - 1 $\beta$  (340.88 pg/ml), valor muy superior a lo reportado por otros estudios (media = 115pg/ml, pacientes sin ITU) (Ko, Mukaida, Ishiyama, Tokue, Kawai, Matsushima, & Kasahara, 1993), nos hace reforzar la idea que en los pacientes estudiados la IL - 1 $\beta$  juega un rol importante en el aclaramiento bacteriano de las UPEC.

La supervivencia bacteriana está en relación directa con su capacidad de atenuar la respuesta inmunológica del hospedero. Las UPEC presentan diversos factores de virulencia que ejercen este efecto. La expresión de la proteína Toll / IL-1 proteína C que contiene receptor (TIR) (Tcpc) se ha revelado como uno de los factores más relevantes, ya que tiene la capacidad de interactuar con el factor de diferenciación mieloide de la molécula adaptadora 88 (MyD88), el cual controla la señalización intracelular de todos los TLRs vía activación del factor de transcripción NF -  $\kappa$  $\beta$ , excepto del TLR3; y además, la proteína Tcpc, tiene la facultad de interactuar directamente con el TLR4, disminuyendo la respuesta intracelular de los TLR4 independientes de MyD88 vía interacción con el dominio TIR - contenedor de proteína adaptadora – inductora de INF –  $\beta$  (TRIF) (Waldhuber, Puthia, Wieser, Cirl, Dürr, Neumann-Pfeifer, & Schubert, 2016). En modelos murinos, enfrentados con la UPEC – CFT073, se observa que la proteína Tcpc ejerce un efecto inhibitor en la síntesis de IL - 1 $\beta$ , estando la expresión de la proteína Tcpc en proporción directa con la capacidad de la bacteria en ascender en las vías urinarias. En un estudio recientemente elaborado por Waldhuber y cols, el 40 – 50% de las UPEC aisladas en pacientes con pielonefritis eran portadoras del gen Tcpc (Waldhuber, et.al, 2016).

En las células infectadas con las CBI, el reconocimiento bacteriano por medio de la familia de receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR) es crucial en su identificación. Específicamente, el NLRP3 tiene un rol protagónico, ya que a través de él se forma el pirótomo o inflamosoma estructurado por un complejo de múltiples proteínas en la cual la proteína ASC y caspasa – 1

juegan un rol protagónico. A través de la activación de la caspasa – 1 se logra la escisión de la pro IL - 1 $\beta$ , permitiendo su activación y posterior liberación (Rathinam, et.al, 2012). En suma, la activación del pirótomo NLRP3 genera la muerte celular programada de la célula permitiendo la liberación de citoquinas y moléculas de patrón molecular asociadas al daño (DAMP). Es relevante mencionar, que la expresión del TcpC además de reducir la liberación de IL - 1 $\beta$ , promueve la sobrevivencia celular en las células uroteliales infectadas, con el fin de preservar su habidad. Interesantemente, la expresión de la proteína TcpC se ha descrito exclusivamente en las clonas de tipo B2, estando fuertemente asociadas a las islas de patogenicidad (Schubert, Nörenberg, Clermont, Magistro, Wieser, Romann & Denamur, 2010), con lo cual la interrupción de la cascada vía TcpC podría explicar, también, que no se observe diferencia significativa entre los grupos clonales B2 y A, B1, D y E.

También hay que considerar que la  $\alpha$  - hemolisina (HlyA), toxina formadora de poros, sintetizada por distintos grupos clonales de UPEC (Salehzadeh & Zamani, 2017), con gran capacidad lítica en un variado tipo de células nucleadas, incluyendo células endoteliales e inmunes, ejerce un efecto inverso al propuesto por la proteína TcpC, activando al pirótomo NLRP3 (Nagamutsu, 2015). Esto se encuentra en concordancia por lo descrito por Smith y cols, el cual describe una pronunciada exfoliación temprana durante la ITU, atribuyendo este fenómeno a la proteína HlyA (Smith, Rasmussen, Grande, Conran, & O'Brien, 2008). Además, en forma contraria al efecto mencionado, se ha descrito que concentraciones sub líticas de HlyA tienen un efecto inhibitorio en la cascada de señalización por NF – k $\beta$ , lo cual implica una menor tasa de síntesis de IL - 1 $\beta$ .

Lo descrito refleja un complejo proceso que surge en cada paciente durante las distintas fases del proceso infeccioso y su capacidad para responder ante los diversos mecanismos de evasión de las UPEC. Por lo que es complicado establecer finalmente la verdadera relación de IL - 1 $\beta$  con las variantes clonales.

## Resultados – TNF – $\alpha$

Las UPEC estimulan una respuesta inflamatoria, (Godaly, Proudfoot, Offord, Svanborg, Agace, 1997), pero la magnitud y la cinética disminuyen en el curso de la infección debido a factores de virulencia aún no descritos en su totalidad (Billips, et.al, 2007). Como se observa en la Tabla 12, hay un incremento en la concentración del TNF –  $\alpha$  en paciente con ITU frente a pacientes sin ITU.

Tabla 12

*Concentración del TNF - alfa en orina pacientes con ITU y sin ITU*

Concentración	Número	TNF - $\alpha$ (pg/mL)	Desviación estándar	Valor p
Con ITU	24	98,8	27,64	0.115
Sin ITU	17	90,7	12,78	

*Nota.- En el cálculo no se ha considerado a los pacientes con concentración no detectable.*

## Prueba de hipótesis

Hipótesis nula. - La concentración de TNF –  $\alpha$  en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es igual a la concentración de TNF –  $\alpha$  con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

Hipótesis alternativa. - La concentración de TNF –  $\alpha$  en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es estadísticamente diferente a la concentración de TNF –  $\alpha$  con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

En el análisis de la concentración del TNF –  $\alpha$  en orina de los pacientes que tuvieron *E.coli* - B2 vs el resto de clonas agrupadas, no encontramos diferencia significativa, como se observa en la tabla 13.

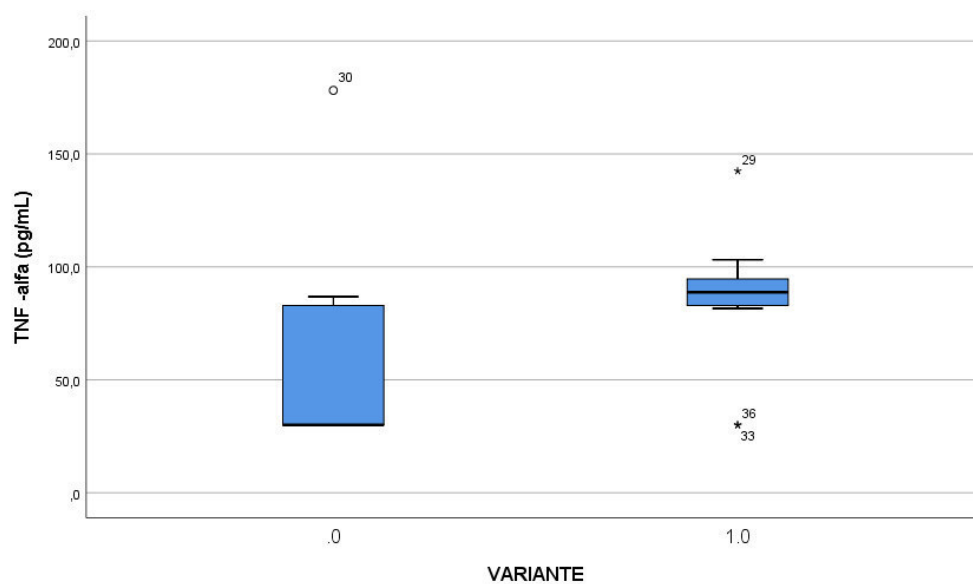
Tabla 13

*Concentración del TNF –  $\alpha$  en orina grupo B2 v.s grupos A,B1,C,D,E*

Grupos filogenéticos	Número	$\bar{X}$ TNF – $\alpha$ (pg/mL)	Desviación estándar	Valor p
Grupo B2	13	84,26	9,5	0,168
Grupo A,B1,C,D,E	11	58,12	12,27	

Podemos sugerir algunas explicaciones para los resultados obtenidos. Por un lado, la variación en la concentración del TNF –  $\alpha$  puede reflejar un estadio distinto de la infección en cada paciente estudiado (pielonefritis o cistitis) (Nickavar, A., Safaeian, B., & Valavi, E. (2016). Como se puede observar en el Gráfica 8, la distribución de la concentración del TNF –  $\alpha$ , en la mayoría de los pacientes con *E.coli* - B2, presentó una baja desviación estándar, habiendo dos resultados con concentraciones disonantes, lo que impidió tener una diferencia significativa en el resultado. También se puede observar que hay una tendencia en los pacientes con *E.coli* - B2 positivos de tener una mayor concentración del TNF –  $\alpha$ , lo cual guarda relación con el mayor grado de virulencia reportado por las clonas B2 (Burman, 2003).

Gráfica 8

Distribución TNF –  $\alpha$ 

Nota.- \*Grupo B2:1, Grupo A,B1,D,E: 0

El TNF –  $\alpha$  tiene una función determinante en el reclutamiento de los neutrófilos, ya que tiene como efecto estimular la diapédesis a través de la membrana basal del urotelio vesical. Esta función ha sido corroborada en modelos murinos deficientes de TNF –  $\alpha$  (Zec, et.al, 2016). Aunque, hay que acotar que la acción del TNF –  $\alpha$  no es directa. En la capa mucosa de la vejiga se ubican macrófagos centinelas residentes de la vejiga (LY6C<sup>-</sup>), los cuales reconocen la presencia de patrones moleculares asociados a patogenicidad (PAMP), estimulando la síntesis de CXCL2, CXCL1, CXCL6 y MIF (el CCL2 estimula el reclutamiento de los macrófagos LY6C<sup>+</sup> y el CXCL1 a los neutrófilos). Los macrófagos, LY6C<sup>+</sup>, reclutados expresan y liberan al TNF –  $\alpha$ , el cual estimula a los macrófagos LY6C<sup>-</sup> en la producción de CXCL2 vía activación del NF –  $\kappa$ B. En los neutrófilos la CXCL2 estimula la expresión de la metaloproteinasa - 9 (MMP9) (Zec, et.al, 2016), la cual tiene una elevada capacidad proteolítica contra: laminina, elastina, fibronectina, colágeno tipo IV y colágeno tipo VII (Okada, 1992) (Fessler, 1984) (Okada, 1990), presentes en las capas estructurales de la vejiga (Schiwon, 2014). No obstante, hay que reconocer que este modelo solo ha sido identificado en murinos con cistitis bacteriana. Además, hay que considerar que si bien el mecanismo descrito es postulado como crucial en la respuesta inmunológica post infección, en pacientes con reinfección (situación usual en PAM), en donde el sistema inmune adaptativo tiene un rol protagónico, la supresión de las células GR1<sup>hi</sup>LY6C<sup>+</sup>, en modelos murinos ha hecho patente la dispensabilidad de este linaje celular en el aclaramiento bacteriano, debido a que limitan la respuesta adaptativa (Zec, Vijitha, Thiebes, Gunzer, Kurts, & Engel, 2016). Aunque, contrario a las expectativas, no se ha observado un aumento en el reclutamiento de linfocitos T y B (Mora-Bau, et.al, 2015).

Por otro lado, también hay que considerar que existe yuxtaposición en la función de reclutamiento de los neutrófilos por medio del TNF –  $\alpha$ . La IL – 8 es una reconocida quimiocina envuelta en el reclutamiento de neutrófilos a través de las capas celulares uroepiteliales infectadas in vitro (Godaly, Proudfoot, Offord, Svanborg & Agace, 1997). Además, existen otras estirpes celulares en el proceso de la ITU que



tienen la capacidad de sintetizar y liberar al TNF –  $\alpha$ . En la literatura se ha descrito que los mastocitos y los natural killers, ubicados en la mucosa vesical también sintetizan TNF –  $\alpha$ , sin embargo no se conoce la función que detentan (Theodoros, 2011).

Además, podemos sugerir que en las muestras de orina con el grupo clonal - *E.coli* - B2 positivo existe una mayor capacidad de evasión de la respuesta inmune en el tracto urinario. La supresión de la expresión de las citoquinas y quimiocinas les permite disminuir el reclutamiento de los neutrófilos en la vejiga y tener una mayor capacidad de formar CBI. Este mecanismo está mediado por la mutagénesis de los operones *rfa* y *rfb*, correspondientes a la síntesis del lipopolisacárido (LPS) y/o la proteína chaperona periplasmática (SurA) (Hunstad, Justice, Hung, Lauer & Hultgren, 2005). En cualquier caso, esto previene su reconocimiento por los TLR4/CD14 de las células uroteliales o inhibición de la activación del NF –  $\kappa$ B. En ensayos in vitro se ha demostrado por medio de la interacción de la cepa prototipo productora de cistitis, NU14, con líneas celulares TEU – 1 (uréter humano), que todos los grupos filogenéticos (B2, A, D), tienen la capacidad de disminuir la producción de citoquinas y quimiocinas entre las cuales están: TNF –  $\alpha$ , IL -6 e IL-8, aunque en el grupo clonal B2 existe un mayor número de genes asociados a este mecanismo (Billips, Forrestal, Rycyk, Johnson, Klumpp & Schaeffer, 2007).

Finalmente, hay que tomar en consideración que la respuesta anti-inflamatoria post-infección en modelos murinos se ha observado entre las 6 a 12 horas post-infección. Esta respuesta tiene la finalidad de contener la respuesta inmune y evitar injurias tisulares en el tejido periférico (Abraham & Miao, 2015). Lo descrito incorporaría una variable no contemplada en el diseño del estudio que es importante considerar en el análisis de la expresión del TNF –  $\alpha$  y su relación frente a las variables filogenéticas de *E.coli*.

## **Resultados - ABTS y FRAP**

La medición de la capacidad antioxidante de la orina (CAO), fue teorizada como un marcador de respuesta inmunológico. En el análisis previo al estudio, consideramos que una menor CAO corresponde a una mayor tasa de consumo de los compuestos que configuran la capacidad antioxidante en la orina. En la respuesta del hospedero frente a la ITU, la producción de ROS es el mecanismo más importante para eliminar a las UPEC (Hanson, 1973). Por lo que una menor CAO cuantificada representaría una mayor respuesta inmune frente a las UPEC.

### **Prueba de hipótesis**

Hipótesis nula. - La CAO en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es igual a la concentración de CAO con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

Hipótesis alternativa. - La concentración de CAO en pacientes con ITU por *E.coli* - B2 positivo es estadísticamente diferente a la concentración de CAO con ITU por *E.coli* - B2 negativo (A,B1,C,D,E).

En el análisis estadístico, t – student, tanto en la prueba de ABTS como en la de FRAP, no pudimos encontrar diferencia significativa entre los grupos filogenéticos B2 y demás grupos, referente a la CAO, en la Tabla 14 se muestra los resultados. Sin embargo, en el examen de ABTS se evidencia una mayor capacidad antioxidante en la orina de los paciente con *E.coli* del grupo filogenético B2, lo cual resulta contrario a las estimaciones iniciales.

El grupo filogenético B2 es el de mayor virulencia, por lo cual esperábamos evidenciar una CAO disminuida en relación a los demás grupos filogenéticos, debido a una respuesta inmune más intensa que corresponda a su mayor virulencia. Aunque, podemos sugerir algunos mecanismos que pueden explicar este resultado.

Tabla 14

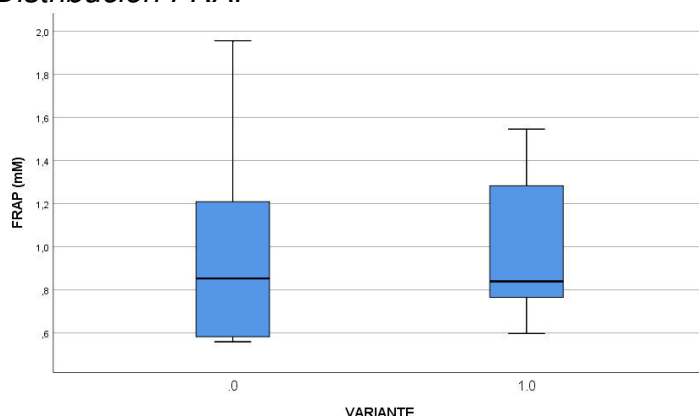
*Resultados de FRAP y ABTS vs grupos filogenéticos E.coli*

Técnica	Grupos filogenéticos <i>E.coli</i>	Concentración en orina	Desviación estándar	Diferencia significativa
FRAP (mM)	Grupo A,B1,C,D,E	0,967	0,13	0.306
	Grupo B2	0,978	0,09	
ABTS (ug/mL)	Grupo A,B1,C,D,E	885,937	162,85	0,121
	Grupo B2	1636,07	561,96	

Hay que tomar en consideración que las bacterias generan, como mecanismo de defensa, moléculas con capacidad antioxidante con las cuales pueden contrarrestar el efecto del estrés oxidativo generado por las células inmunitarias. La *E.coli* posee sistemas enzimáticos y no enzimáticos que le permiten defenderse de los efectos del estrés oxidativo: dos catalasas, HPI y HPII, codificadas por los genes *katG* y *katE*, respectivamente, superóxido dismutasa (SOD), codificadas por *sodA* y *sodB*, glutatión sintetasa (*gshAB*), hidróperóxido reductasa (*ahpC*), y glutatión reductasa (*gor*). Además, entre los principales compuestos, no enzimáticos, el glutatión reducido (GSH), tioredoxina (*trxA*), ubiquinona y menaquinona, estando estos dos últimos asociados a nivel de la membrana, configuran un gran reservorio para contrarrestar el efecto de las ROS producidos en su interacción con las células inmunitarias (Farr, & Kogoma, 1991). En estudios previos, se ha demostrado que las UPEC con un sistema de defensa antioxidante más activo incrementan su capacidad de colonización en la vejiga (Johnson, Clabots & Rosen, 2006), por lo que podríamos sugerir que la CAO analizada corresponde no solo a la otorgada por el hospedero, sino también por las UPEC, lo cual nos podría indicar que parte de la capacidad de supervivencia del grupo filogenético B2 se debe a su gran capacidad antioxidante, fenómeno poco estudiado en ITU.

En la evaluación del CAO por medio del FRAP, como se muestra en la Gráfica 9, las medias de su capacidad reductora son muy cercanas, lo cual puede sugerir otras explicaciones.

Gráfica 9  
Distribución FRAP



Nota.- Grupo B2:1, Grupo A,B1,D,E: 0

Por otro lado, lo observado, también, podría explicarse por una deficiencia en la producción de ROS por parte de los neutrófilos reclutados, lo cual explicaría la baja tasa de consumo de la CAO. Lo señalado, presenta un sustento añadido con los ensayos de CAO realizados en pacientes sin ITU, entre los cuales no se evidenció diferencia significativa, de la CAO, entre los pacientes con ITU y sin infección. La PAM presenta un estado subclínico de inflamación crónica, conocida como inmunosenescencia, con deficiencia funcional en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup> y células polimorfonucleares -neutrófilos en comparación con población joven, además de presentar niveles elevados de citoquinas en sangre (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ). En PAM los neutrófilos presentan deficiencia en su capacidad fagocítica, quimiotáctica, liberación de trampas extracelulares y rescate apoptótica por mediadores proinflamatorios (Fulop, 2004), aunque, existe poco consenso en referencia a la disfuncionalidad de los neutrófilos en relación a su producción de ROS. Algunos autores postulan una disminución en la capacidad de producción de ROS (Fulop, 2004), mientras que otros indican que no hay diferencia entre los grupos etarios (Wenisch, Patruta, Daxböck, Krause & Hörl, 2000), y algunos indican que hay un aumento en sus capacidades (Butcher, 2001). Los neutrófilos, hasta hace poco considerados una población celular homogénea, capaces de fagocitar y destruir agentes bacterianos en el sitio de infección, seguida de una rápida apoptosis y aclaramiento por macrófagos residentes, están conformados, por al

menos, tres subpoblaciones definidas por la expresión a nivel de membrana de CD16 y CD62L, presentando funciones diferenciadas. La estirpe celular CD16<sup>aumentado</sup>/CD62L<sup>diminuido</sup>, la cual ha guardado mayor interés, tiene la capacidad de suprimir la proliferación de los linfocitos T, mediada por MAC - 1 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En un estudio reciente, realizado por Sauce y cols, se evaluó las capacidades de adhesión, fagocitosis y producción de ROS en neutrófilos de sangre periférica de PAM. Entre los resultados más destacables se observó que existe un menor nivel de fagocitosis en los neutrófilos y hay un aumento del 14% de la subpoblación CD16<sup>aumentado</sup>/CD62L<sup>diminuido</sup>, en relación a personas jóvenes. En personas jóvenes la subpoblación CD16<sup>aumentado</sup>/CD62L<sup>diminuido</sup> representa el 1% de los neutrófilos circulantes. En el análisis de las características inmunes de esta subpoblación se encontró que el índice fagocítico y la síntesis de ROS frente a la subpoblación CD16<sup>aumentado</sup>/CD62L<sup>aumentado</sup> (predominante en población joven), era menor. En relación a nuestro estudio, esto implica que si en promedio, la concentración de leucocitos en orina de los pacientes que presentaron *E.coli* – B2, fue de 344 leucocitos/uL (siendo la mayor parte neutrófilos), el 14% (48 leucocitos/uL), serían representantes de la estirpe CD16<sup>aumentado</sup>/CD62L<sup>diminuido</sup>, lo cual podría explicar ,en parte, la baja producción de ROS.

Por otro lado, la tendencia de mayor CAO en pacientes con ITU (Tabla 15), podría deberse a una respuesta endógena y/o exógena que le permitiría contrarrestar el daño celular que ocasiona el estrés oxidativo en los tejidos periféricos al lugar de infección. Entre los elementos de respuesta endógena que pueden lograr contener el estrés oxidativo en la orina se encuentra el ácido úrico.

También, hay que tomar en consideración que la PAM residente en CRG, presenta una dieta suplementada y que la ingesta de productos, como el arandano rojo en jugo (Cranberry) y la vitamina C, los cuales tienen un uso extendido en la prevención de las ITU (Vasileiou, Katsargyris, Theocharis & Giaginis, 2013) (Tradewell, Pariser, Nimeh, Elliott & Neurogenic Bladder Research Group, 2018), contienen una alta capacidad antioxidante debido a sus componentes fenólicos y capacidad reductora, respectivamente (Baranowska & Bartoszek, 2016). Finalmente, debido al tipo de

población estudiada se espera que presenten algunas particularidades en relación a su interacción con las UPEC, debido a variaciones fisiológicas que pueden condicionar su respuesta. En mujeres post-menopáusicas, los bajos niveles de estradiol se postulan como un factor de riesgo que contribuye a causar ITUs recurrentes (Mody and Juthani-Mehta, 2014). En modelos murinos con ovariectomía (simulación de menopausia), se encontró mayor dificultad en eliminar a las UPEC, además de una carga bacteriana mayor y un proceso inflamatorio mayor en relación al control (no ovariectomía). (Wang C, 2013). El estrógeno es un importante modulador del crecimiento y diferenciación de las células uroteliales; y además, regula dos mecanismos de defensa, ya que induce la producción intracelular de AMPc y reduce la exfoliación epitelial (Luthje et al., 2013).

Tabla 15

*Resultados de la CAO en orina de pacientes con ITU y sin ITU*

Técnica	PAM	Número	CAO	Desviación estándar
ABTS (ug/mL)	Con ITU	24	1229,7	1354,99
	Sin ITU	17	1069,1	610,72
FRAP (mM)	Con ITU	24	0,97	0,40
	Sin ITU	17	0,88	0,40

En resumen, primero, de forma contraria a los resultados esperados existe una alta disponibilidad de hierro en la orina de los PAM con ITU, lo cual estimula la proliferación bacteriana; segundo, hay una mayor capacidad antioxidante en la orina de los paciente con *E.coli* del grupo filogenético B2 , tercero, hay una elevada presencia clonal de *E.coli* de tipo no B2 en las CRG y cuarto, existe una elevada variación de los análisis medidos lo cual nos impidió obtener resultados más concluyentes.

## CAPITULO V: CONCLUSIONES

1. Se evidencia una tendencia diferenciada en la respuesta inmunometabólica de los marcadores cuantificados frente a los grupos clonales de *Escherichia coli* uropatógena estudiados.
2. Se ha encontrado una tendencia positiva en los pacientes infectados con *E.coli* perteneciente al grupo filogenético B2 de tener una mayor expresión de TNF –  $\alpha$  y IL - 1 $\beta$ .
3. Habría una tendencia positiva en los pacientes infectados con *E.coli* perteneciente al grupo filogenético B2 de presentar una mayor concentración de hierro en orina.
4. Los pacientes infectados con *E.coli* perteneciente al grupo filogenético B2 tienen una tendencia de tener mayor capacidad antioxidante por medio de la prueba ABTS.

## CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

1. Aumentar el tamaño poblacional para corroborar los resultados expuestos ya que la elevada desviación estándar en los analitos medidos no permite realizar conclusiones.
2. Incorporar información clínica de los pacientes que permita determinar el estado de la infección, uso de antibióticos y número de infecciones previas.
3. Estudiar los factores de virulencia en las *E.coli* aisladas de pacientes con ITU residentes en centros de reposo gerontológico para determinar el grado de riesgo en el que se encuentran ya que existen determinados marcadores de virulencia asociados a sepsis (TcpC).



## CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Pober, J. S., & Lichtman, A. H. (1995). *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Abraham, S. N., & Miao, Y. (2015). The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nature Reviews Immunology*, 15(10), 655.
- Alteri, C. J., & Mobley, H. L. (2007). Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infection and immunity*, 75(6), 2679-2688.
- Alteri, C. J., Hagan, E. C., Sivick, K. E., Smith, S. N., & Mobley, H. L. (2009). Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog*, 5(9), e1000586.
- Alteri, C. J., Smith, S. N., & Mobley, H. L. (2009). Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog*, 5(5), e1000448.
- Alteri, C. J., & Mobley, H. L. (2015). Metabolism and fitness of urinary tract pathogens. *Microbiology spectrum*, 3(3).
- Baranowska, M., & Bartoszek, A. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of bioactive phytochemicals from cranberry. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 70, 1460-1468.
- Billips, B. K., Forrestal, S. G., Rycyk, M. T., Johnson, J. R., Klumpp, D. J., & Schaeffer, A. J. (2007). Modulation of host innate immune response in the bladder by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 75(11), 5353-5360.
- Bullen, J. J. 1981. The significance of iron in infection. *Rev Infect. Dis.* 3:1127-1137.

- Brooks, T., & Keevil, C. W. (1997). A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in applied microbiology*, 24(3), 203-206.
- Burman, W. J., Breese, P. E., Murray, B. E., Singh, K. V., Batal, H. A., MacKenzie, T. D., ... & Mehler, P. S. (2003). Conventional and molecular epidemiology of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among urinary *Escherichia coli* isolates. *The American journal of medicine*, 115(5), 358-364.
- Butcher, S. K., Chahal, H., Nayak, L., Sinclair, A., Henriquez, N. V., Sapey, E., ... & Lord, J. M. (2001). Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *Journal of leukocyte biology*, 70(6), 881-886.
- Cauthen, S. E., Foster, M. A., & Woods, D. D. (1966). Methionine synthesis by extracts of *Salmonella typhimurium*. *Biochemical Journal*, 98(2), 630.
- Centro de atención residencial para personas adultas mayores – CARPAM. Ministerio de la mujer y poblaciones vulnerables. Recuperado el 16 de Abril 2017, de:  
[https://www.mimp.gob.pe/adultomayor/archivos/Carpam\\_directorio.pdf](https://www.mimp.gob.pe/adultomayor/archivos/Carpam_directorio.pdf)
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4555-4558.
- Ciftci, H., Verit, A., Yeni, E., & Savas, M. (2008). Decreased oxidative stress index of urine in patients with urinary tract infection. *Urologia internationalis*, 81(3), 312-315.
- Davis, B. D., & Mingioli, E. S. (1950). Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *Journal of bacteriology*, 60(1), 17.
- Davidoff, R., Yamaguchi, R., Leach, G. E., Park, E., & Lad, P. M. (1997). Multiple urinary cytokine levels of bacterial cystitis. *The Journal of urology*, 157(5), 1980-1985.
- Ejrnæs, K. (2011). Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*, 58(4), B4187.

- Engelhart, S. T., Hanes-Derendorf, L., Exner, M., & Kramer, M. H. (2005). Prospective surveillance for healthcare-associated infections in German nursing home residents. *Journal of Hospital Infection*, 60(1), 46-50.
- Farr, S. B., & Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological reviews*, 55(4), 561-585.
- Fessler, L. I., Duncan, K. G., Fessler, J. H., Salo, T., & Tryggvason, K. (1984). Characterization of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *Journal of Biological Chemistry*, 259(15), 9783-9789.
- Fu, Z., Liska, D., Talan, D., & Chung, M. (2017). Cranberry Reduces the Risk of Urinary Tract Infection Recurrence in Otherwise Healthy Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of nutrition*, 147(12), 2282-2288.
- Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Fortin, C., Guérard, K. P., Lesur, O., ... & Dupuis, G. (2004). Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging cell*, 3(4), 217-226.
- Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., & Mobley, H. L. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and immunity*.
- Godaly, G., Proudfoot, A. E., Offord, R. E., Svanborg, C., & Agace, W. W. (1997). Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in *Escherichia coli*-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infection and immunity*, 65(8), 3451-3456.
- Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J., & Mobley, H. L. (2010). *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathog*, 6(11), e1001187.
- Hanson, L. Å. (1973). Host-parasite relationships in urinary tract infections. *The Journal of infectious diseases*, 127(6), 726-730.
- Hayes, B. W., & Abraham, S. N. (2016). Innate Immune Responses to Bladder Infection. *Microbiology spectrum*, 4(6).

- Hunstad, D. A., Justice, S. S., Hung, C. S., Lauer, S. R., & Hultgren, S. J. (2005). Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 73(7), 3999-4006.
- a Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2017). Situación de la Población Adulta Mayor (Nº1). Recuperado de : [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/01-informe-tecnico-n01\\_adulto-mayor-oct-dic2016.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/01-informe-tecnico-n01_adulto-mayor-oct-dic2016.pdf)
- b Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2017) Perú: Principales Indicadores Departamentales 2009 – 2016. Recuperado de : [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1421/libro.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1421/libro.pdf)
- Johnson, J. R., Clabots, C., & Rosen, H. (2006). Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator oxyR on the colonization ability of *Escherichia coli* O1: K1: H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infection and immunity*, 74(1), 461-468.
- Jeffrey G. Lawrence & John R. Roth. (1995). The Cobalamin (Coenzyme B12) Biosynthetic Genes of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177, 6371–6380.
- Kammler, M. E. I. K. E., Schön, C., & Hantke, K. L. A. U. S. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 175(19), 6212-6219.
- Kassir, K., Vargas-Shiraishi, O., Zaldivar, F., Berman, M., Singh, J., & Arrieta, A. (2001). Cytokine profiles of pediatric patients treated with antibiotics for pyelonephritis: potential therapeutic impact. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(6), 1060-1063.
- Keberle, H. (1964). A simple and rapid method for the assay of iron in the urine after the administration of desferrioxamine. Communication from the research laboratories, CIBA limited, Basle.
- Klumpp, D. J., Weiser, A. C., Sengupta, S., Forrestal, S. G., Batler, R. A., & Schaeffer, A. J. (2001). Uropathogenic *Escherichia coli* Potentiates Type 1

Pilus-Induced Apoptosis by Suppressing NF- $\kappa$ B. *Infection and immunity*, 69(11), 6689-6695.

- Ko, Y. C., Mukaida, N., Ishiyama, S., Tokue, A., Kawai, T., Matsushima, K., & Kasahara, T. (1993). Elevated interleukin-8 levels in the urine of patients with urinary tract infections. *Infection and immunity*, 61(4), 1307-1314.
- Kurutas B E, Ciragil P, Gul M: The Effects of Oxidative Stress in Urinary Tract Infection. Cairo, Hindawi Publishing, 2005, vol 4, pp 242–244.
- Lagos, B. R. G., & Pinto, B. P. P. REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.
- Loughman, J. A., & Hunstad, D. A. (2011). Attenuation of human neutrophil migration and function by uropathogenic bacteria. *Microbes and infection*, 13(6), 555-565.
- Luo, Guoyang., Niesel, D. W., Shaban, R. A., Grimm, E. A., & Klimpel, G. R. (1993). Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infection and immunity*, 61(3), 830-835.
- Martins, S. M., Darlin, D. J., Lad, P. M., & Zimmern, P. E. (1994). Interleukin-1B: a clinically relevant urinary marker. *The Journal of urology*, 151(5), 1198-1201.
- Montoya, A., & Mody, L. (2011). Common infections in nursing homes: a review of current issues and challenges. *Aging health*, 7(6), 889-899.
- Mora-Bau, G., Platt, A. M., van Rooijen, N., Randolph, G. J., Albert, M. L., & Ingersoll, M. A. (2015). Macrophages subvert adaptive immunity to urinary tract infection. *PLoS pathogens*, 11(7), e1005044.
- Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., Tailliez, P., Kao, M. R., Brée, A., Germon, P., ... & Blanco, J. (2006). Common virulence factors and genetic relationships between O18: K1: H7 Escherichia coli isolates of human and avian origin. *Journal of clinical microbiology*, 44(10), 3484-3492.
- Nicolle, L. E. (1994). Urinary tract infection in the elderly. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(suppl A), 99-109.

- Nicolle, L. E. (2016). Urinary tract infections in the older adult. *Clinics in geriatric medicine*, 32(3), 523-538.
- Nickavar, A., Safaeian, B., & Valavi, E. (2016). Evaluation and Comparison of Urinary Cytokines for the Diagnosis of Acute Pyelonephritis. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 4(4).
- Nowrouzian, F. L., Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2006). Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes and Infection*, 8(3), 834-840.
- Nowrouzian, F. L., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2005). *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *Journal of Infectious Diseases*, 191(7), 1078-1083.
- Olson, P. D., & Hunstad, D. A. (2016). Subversion of host innate immunity by uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens*, 5(1), 2.
- Y. Okada, Y. Gonoji, K. Naka, K. Tomita, I. Nakanishi, A. Iwata, *et al*(1992). Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem*, 267 (1992), pp. 21712-21719
- Pobiega, M., Wojkowska-Mach, J., Chmielarczyk, A., Romaniszyn, D., Adamski, P., Heczko, P. B., ... & Grodzicki, T. (2013). Molecular characterization and drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from urine from long-term care facility residents in Cracow, Poland. *Medical Science Monitor*, 19, 317-326.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... & Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and immunity*, 67(2), 546-553.
- Pfrimer, K., Micheletto, R. F., Marchini, J. S., Padovan, G. J., Moriguti, J. C., & Ferriolli, E. (2014). Impact of aging on urinary excretion of iron and zinc. *Nutrition and metabolic insights*, 7, NMI-S12977.

- Rahav, G., Pinco, E., Bachrach, G., & Bercovier, H. (2003). Molecular epidemiology of asymptomatic bacteriuria in the elderly. *Age and ageing*, 32(6), 670-673.
- Rathinam, V. A., Vanaja, S. K., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L. M., ... & Fitzgerald, K. A. (2012). TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell*, 150(3), 606-619.
- Rowe, T. A., & Juthani-Mehta, M. (2013). Urinary tract infection in older adults. *Aging health*, 9(5), 519-528.
- Richards, C. L. (2004). Urinary tract infections in the frail elderly: issues for diagnosis, treatment and prevention. *International urology and nephrology*, 36(3), 457-463.
- Rimbach, G., & Fuchs, J. (Eds.). (2005). *Nutrigenomics*. CRC Press.
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical microbiology and infection*, 12(9), 880-886.
- Salva, A., Coll-Planas, L., Bruce, S., De Groot, L., Andrieu, S., Abellan, G., & Vellas, B. (2009). Nutritional assessment of residents in long-term care facilities (LTCFs): recommendations of the task force on nutrition and ageing of the IAGG European region and the IANA. *JNHA-The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 13(6), 475-483.
- Sauce, D., Dong, Y., Campillo-Gimenez, L., Casulli, S., Bayard, C., Autran, B., ... & Elbim, C. (2016). Reduced oxidative burst by primed neutrophils in the elderly individuals is associated with increased levels of the CD16<sup>bright</sup>/CD62L<sup>dim</sup> immunosuppressive subset. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 72(2), 163-172.
- Scarlett, F. A., & Turner, J. M. (1976). Microbial metabolism of amino alcohols. Ethanolamine catabolism mediated by coenzyme B12-dependent ethanolamine ammonia-lyase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *Microbiology*, 95(1), 173-176.

- Schaible, U. E., Collins, H. L., Priem, F., & Kaufmann, S. H. (2002). Correction of the iron overload defect in  $\beta$ -2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*, 196(11), 1507-1513.
- Schubert, S., Nörenberg, D., Clermont, O., Magistro, G., Wieser, A., Romann, E., ... & Denamur, E. (2010). Prevalence and phylogenetic history of the TcpC virulence determinant in *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(7), 429-434.
- Sernicharo, G. P, Coronel, I.D.R.K y DGAL. Día mundial de la población (datos actualizados). 24.11.2019, de Instituto Belisario Domínguez Sitio web: [http://bibliodigitalibd.senado.gob.mx/bitstream/handle/123456789/2163/AD4\\_3.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliodigitalibd.senado.gob.mx/bitstream/handle/123456789/2163/AD4_3.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Smati, M., Clermont, O., Le Gal, F., Schichmanoff, O., Jauréguy, F., Eddi, A., ... & Picard, B. (2013). Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Applied and environmental microbiology*, 79(16), 5005-5012.
- Snyder, J. A., Haugen, B. J., Buckles, E. L., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Donnenberg, M. S., ... & Mobley, H. L. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infection and immunity*, 72(11), 6373-6381.
- Stevenson, K. B., Moore, J., Colwell, H., & Sleeper, B. (2005). Standardized Infection Surveillance in Long-Term Care Interfacility Comparisons From a Regional Cohort of Facilities. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 26(03), 231-238.
- Suárez, S. (2014). *Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del Allium sativum var. Huaralino (ajo) en modelos in vitro*. (Tesis de Doctorado).
- Thakur, R. P., Banerjee, A., & Nikumb, V. B. (2013). Health Problems Among the Elderly: A Cross. Sectional Study. *Annals of medical and health sciences research*, 3(1), 19-25.



- Theodoros, K. (2011). Urinary tract immunology. In *Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection*. InTech.
- Tradewell, M., Pariser, J. J., Nimeh, T., Elliott, S. P., & Neurogenic Bladder Research Group. (2018). Systematic review and practice policy statements on urinary tract infection prevention in adults with spina bifida. *Translational andrology and urology*, 7(Suppl 2), S205.
- Tramuta, C., Nucera, D., Robino, P., Salvarani, S., & Nebbia, P. (2011). Virulence factors and genetic variability of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Italy. *Journal of veterinary science*, 12(1), 49-55.
- Vasileiou, I., Katsargyris, A., Theocharis, S., & Giaginis, C. (2013). Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutrition research*, 33(8), 595-607.
- Vigil, P. D., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Hooton, T. M., Hodges, A. P., He, Y., & Mobley, H. L. (2011). Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract. *MBio*, 2(3), e00066-11.
- Waldhuber, A., Puthia, M., Wieser, A., Cirl, C., Dürr, S., Neumann-Pfeifer, S., ... & Schubert, S. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 disrupts NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of clinical investigation*, 126(7), 2425-2436.
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 611-647.
- Watanabe, F., Katsura, H., Takenaka, S., Fujita, T., Abe, K., Tamura, Y., ... & Nakano, Y. (1999). Pseudovitamin B12 is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(11), 4736-4741.
- Wenisch, C., Patruta, S., Daxböck, F., Krause, R., & Hörl, W. (2000). Effect of age on human neutrophil function. *Journal of leukocyte biology*, 67(1), 40-45.

- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and molecular pathology*, 85(1), 11-19.
- Xiu-Yan, L. A. N. G., ZHANG, Y. L., JIANG, H. T., Jiao, L. I. U., & Hong-Bo, N. I. (2013). Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin. *African Journal of Microbiology Research*, 7(31), 4001-4005.
- Zec, K., Volke, J., Vijitha, N., Thiebes, S., Gunzer, M., Kurts, C., & Engel, D. R. (2016). Neutrophil migration into the infected uroepithelium is regulated by the crosstalk between resident and helper macrophages. *Pathogens*, 5(1), 15.
- Zav'yalov, V. P., Chernovskaya, T. V., Navolotskaya, E. V., Karlyshev, A. V., MacIntyre, S., Vasiliev, A. M., & Abramov, V. M. (1995). Specific high affinity binding of human interleukin 1 $\beta$  by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis*. *FEBS letters*, 371(1), 65-68.
- Zdziarski, J., Brzuszkiewicz, E., Wullt, B., Liesegang, H., Biran, D., Voigt, B., ... & Daniel, R. (2010). Host imprints on bacterial genomes—rapid, divergent evolution in individual patients. *PLoS Pathog*, 6(8), e1001078.

## CAPITULO VIII: ANEXOS

### Anexo 1.- PCR cuádruplex. Variantes filogenéticas de E.coli

